



TESIS DOCTORAL

Resistencia a colistina en enterobacterias zoonóticas

M^a DEL ROCÍO IGLESIAS PARRO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

CÁCERES, 2018

Conformidad de los directores:

Segundo Píriz Durán, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura,

Alberto Quesada Molina, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICAN

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado “Resistencia a colistina en enterobacterias zoonóticas”, del cual es autora la Licenciada en Veterinaria **M^a del Rocío Iglesias Parro**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética y los laboratorios de la Unidad de Microbiología del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura. Y reúne la calidad científica necesaria para ser presentado por la interesada con el fin de optar al grado de Doctora por la Universidad de Extremadura.

Por ello, informamos favorablemente para que se proceda a su defensa,

Segundo Píriz Durán

Alberto Quesada Molina

**“Higia pecoris,
salus populi”**

Lema de la profesión Veterinaria en España

AGRADECIMIENTOS

En 2014 me embarqué en este nuevo objetivo cambiando mi gran pasión, los animales de compañía, por otra de las áreas de la Veterinaria que más me gustan: la Salud Pública y Animal. Fue gracias a esas sustituciones de fines de semanas, festivos y vacaciones en clínicas veterinarias de Cáceres que conocí a compañeros de profesión, que hoy en día son algo más que compañeros, son amigos.

A finales de 2015 gracias a un contrato predoctoral de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno pude continuar esta andadura. Además del sustento económico doy las gracias la Fundación, y a todo el personal que forma parte de ella, por su trato exquisito con todos y cada uno de los doctorandos que están bajo su cargo.

He de agradecer también a mis directores, Alberto Quesada Molina y Segundo Píriz Durán, por confiar en mí para desarrollar esta investigación, por la relevancia que pueden tener en un futuro los resultados en la profesión Veterinaria, y sobre todo en el área de la Salud Pública y Animal.

Además me gustaría dar las gracias a todos los compañeros de laboratorio, sobre todo a Gonzalo Palomo, por ayudarme al inicio de esta aventura microbiológica, y Alejandro Gallardo, por enseñarme los secretos de la qPCR. Así como al equipo de VISAVET por las cepas resistentes a colistina, sin las cuales no podría realizarse esta investigación. A David, Marta y Narciso, compañeros del ITACyL, gracias por realizar el análisis genómico de las cepas y por supuesto, un millón de gracias, por acogerme tan bien y enseñarme tanto en tan poco tiempo, sin vuestra ayuda parte de esta investigación no habría sido posible.

A esta tesis le agradezco los buenos amigos que me ha traído, y es que en el transcurso de la misma he conocido a grandes personas y mejores amigos, gracias Jose Martín y Esther Barroso por esos buenos momentos que hemos compartido y que nos quedan por compartir. A Marta Calderón, compañera de batallas microbiológicas y amiga, gracias por estar ahí. A Oscar por ayudarme,

apoyarme y acompañarme, no solo en este capítulo profesional sino en esta aventura que es la vida.

Y finalmente, agradecer a mis padres, Conce y Miguel, y a mi hermanito, Miguel, por estar en todos los buenos y malos momentos, gracias por apoyarme y darme el empujón siempre que lo he necesitado, gracias por estar ahí siempre, gracias por ayudarme a conseguir todos y cada uno de mis sueños y sobre todo gracias por ser como sois. Os quiero mucho.

***A mis seres queridos,
en especial a mi familia y amigos.***

Resumen

Actualmente en España, las infecciones producidas por bacterias resistentes a los antimicrobianos causan 30 veces más muertes que los accidentes de tráfico, y se prevé que en 2050 sea la primera causa de muerte a nivel mundial. Debido a la escasez de nuevos antibióticos para combatirlos el tratamiento de estas infecciones bacterianas es muy complicado, siendo necesario utilizar los denominados “de último recurso”, como la colistina, un antibiótico de naturaleza peptídica que es utilizado para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram negativas. La nefrotoxicidad y neurotoxicidad de este compuesto limitó su uso en medicina humana, sin embargo en veterinaria se utilizó ampliamente para el tratamiento y prevención de infecciones gastrointestinales en porcino y avicultura.

Hace unos años se documentó la aparición de bacterias resistentes a colistina en cepas de origen animal. En 2015, la aparición de un determinante de resistencia a colistina transferible horizontalmente (*mcr-1*) disparó las alarmas, marcando un antes y un después en el uso de este antibiótico. La OMS estableció la colistina como antibiótico de importancia crítica de máxima prioridad y, posteriormente, la EMA y la AEMPS marcaron unas directrices que limitan el uso de la colistina en veterinaria. Teniendo en cuenta estos antecedentes, y la necesidad de profundizar en el conocimiento de la resistencia a la colistina, el objetivo de esta tesis doctoral es estudiar los mecanismos moleculares que disminuyen la susceptibilidad a este antimicrobiano en enterobacterias zoonóticas.

Tras analizar 108 cepas resistentes a colistina procedentes de aislados clínicos animales, formadas por 80 cepas de *Escherichia coli*, 28 cepas de *Salmonella enterica*; y un modelo *in vitro* en el que se seleccionaron 10 mutantes resistentes a colistina procedentes de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, observamos que, tanto en los aislados clínicos como en los *in vitro*, la resistencia a colistina se co-expresa con la resistencia a polimixina B. En los aislados clínicos, el mecanismo de resistencia a colistina prevalente es el gen *mcr-1*, aunque en algunas cepas de *Escherichia coli* encontramos la presencia

de los genes *mcr-3* (en combinación con el gen *mcr-1*) y *mcr-4* (en combinación con el gen *mcr-1* o con polimorfismos en el sistema *pmrAB*). Por otro lado, los aislados clínicos que presentaron determinantes de tipo *mcr* presentaron fenotipos estables tras ocho ciclos de crecimiento sin antibiótico, mientras que las cepas de *Salmonella enterica* con polimorfismos en el sistema *pmrAB* o sin determinante descrito fueron inestables. En los aislados *in vitro* se detectaron nuevos polimorfismos en el sistema *pmrAB*: R81S en *pmrA* y L14Q, Q99P y V133F en *pmrB*, cuyo papel en la resistencia a la colistina se evidenció mediante mutagénesis dirigida. Por otro lado, solo uno de los mutantes seleccionados *in vitro*, CR4, no presenta determinantes de resistencia a colistina previamente descritos en la bibliografía. El análisis genómico del mutante CR4 ha permitido identificar varios polimorfismos respecto a su cepa de referencia, por lo que la identificación de este determinante de resistencia a colistina requiere futuros análisis.

Summary

Nowadays, in Spain, infections caused by antibiotic resistant bacteria bring out 30 times more deaths than traffic accidents, and it is expected that in 2050 it will be the first cause of death worldwide. The treatment of bacterial infections is extremely complicated due to the shortage of new antibiotics and it is necessary use last resort antibiotics as colistin, an antibiotic of peptide nature that is used to treat infections produced by Gram negative bacteria. Nephrotoxicity and neurotoxicity of colistin limited its use in human medicine during years, however, in veterinary medicine it was used for treatment and prevention of gastrointestinal infections in swine and poultry.

Recently, colistin resistant bacteria from animals were documented. In 2015, the emergence of a horizontally transferable colistin resistance determinant (*mcr-1*) triggered the alarms, marking a before and after in the use of this antibiotic. The WHO established colistin as a critical antibiotic of great importance and, subsequently, EMA and AEMPS set guidelines that limit the use of colistin in veterinary medicine. Taking into account these antecedents, and also that not all the mechanisms that confer colistin resistance were known, the main objective of this thesis is to study the mechanisms of colistin resistance in zoonotic enterobacteria.

After analyzing 108 colistin resistant strains from animals clinical isolates, formed by 80 *Escherichia coli*'s strains, 28 *Salmonella enterica*'s strains; and also, an *in vitro* model in which 10 colistin resistant mutants were selected from *Escherichia coli* ATCC 25922, we observed that, in all cases that colistin resistance is co-expressed with resistance to polymyxin B. In our study, in clinical isolates the prevailing mechanism is the *mcr-1* gene, although in some strains of *Escherichia coli* we found *mcr-3* (in combination with *mcr-1*) and *mcr-4* genes (in combination with *mcr-1* or polymorphisms in *pmrAB*). On the other hand, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* clinical isolates that presented *mcr*-like determinants presented stable phenotypes, whereas *Salmonellas*' with polymorphisms in *pmrAB* were unstable. When performing the directed mutagenesis experiment, we confirmed that the polymorphisms R81S in *pmrA*,

and L14Q, Q99P and V133F in *pmrB* confer colistin resistance. On the other hand, one of the mutants selected *in vitro*, CR4, does not present colistin resistant determinants previously described, although its genomic analysis reveals several polymorphisms that require further studies to be confirmed.

ÍNDICE

I. ÍNDICES Y ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS	XIII

II. TRABAJO DE TESIS

INTRODUCCIÓN

	1
1.1. SITUACIÓN ACTUAL SOBRE LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIMICROBIANOS	3
1.2. TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS MULTIRRESISTENTES. ANTIBIÓTICOS DE IMPORTANCIA CRÍTICA EN MEDICINA HUMANA	5
1.3. COLISTINA	7
1.3.1. Uso de colistina en medicina humana	7
1.3.1.1. Toxicidad de las polimixinas	10
1.3.2. Uso de la colistina en medicina veterinaria	11
1.3.3. Naturaleza química de las polimixinas	14
1.4. ENVUELTA CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	15
1.4.1. Biosíntesis del lipopolisacárido	18
1.4.1.1. Decoración del lipopolisacárido en <i>Salmonella enterica</i> y <i>Escherichia coli</i>	19
1.5. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS POLIMIXINAS	21

1.5.1. Espectro de actividad y bacterias intrínsecamente resistentes	22
1.5.2. Mecanismos de resistencia a colistina	23
1.5.2.1. Bacterias intrínsecamente resistentes a colistina ..	25
1.5.2.2. Mecanismos de resistencia a colistina adquiridos en la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	25
1.5.2.2.1. Mecanismos de resistencia a colistina de naturaleza cromosómica	26
1.5.2.2.2. Mecanismos de resistencia a colistina de naturaleza plasmídica	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
OBJETIVOS	45
ESQUEMA DE TRABAJO	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO	55
5.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	55
5.1.1.1. Mutantes espontáneos independientes resistentes a colistina procedentes de la cepa de colección <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	55
5.1.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> de origen animal	56
5.1.2. Cepas de <i>Salmonella enterica</i> de origen animal	57
5.1.3. Cepas de colección de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enterica</i> utilizadas en esta investigación	57
5.1.3.1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	57
5.1.3.2. <i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue	57
5.1.3.3. <i>Escherichia coli</i> J53	58

5.1.3.4.	<i>Escherichia coli</i> SM-10	58
5.1.3.5.	<i>Salmonella enterica</i> serovar Braenderup	58
5.2.	TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	58
5.2.1.	Conservación de las cepas bacterianas	58
5.2.1.1.	Conservación de cepas bacterianas en crioviales ...	59
5.2.1.2.	Conservación de cepas bacterianas en glicerol	59
5.2.2.	Estudio de sensibilidad antimicrobiana	60
5.2.2.1.	Determinación de la CMI mediante el método de microdilución en caldo	60
5.2.2.2.	Determinación de la heterorresistencia	60
5.2.2.2.1.	E- test	60
5.2.2.2.2.	Estudio del perfil del análisis de la población	60
5.2.3.	Curvas de crecimiento bacteriano	61
5.2.3.1.	Mutantes espontáneos independientes resistentes a colistina procedentes de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	62
5.2.3.1.1.	Curva de crecimiento	62
5.2.3.1.2.	Tasa de generación	62
5.2.3.2.	Cepas bacterianas resistentes a colistina de origen animal	63
5.2.4.	Estudio de la estabilidad del fenotipo de resistencia a colistina.....	63
5.3.	TÉCNICAS MOLECULARES	65
5.3.1.	Extracción de ácidos nucleicos	65
5.3.1.1.	Extracción del ADN cromosómico	65
5.3.1.2.	Extracción del ARN	66
5.3.2.	Conservación de los ácidos nucleicos	67
5.3.3.	Electroforesis de agarosa para la cuantificación de ácidos nucleicos y fragmentos	67

5.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de genes de resistencia	67
5.3.4.1. Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados	69
5.3.4.2. Análisis bioinformático	69
5.3.5. Caracterización de los plásmidos con determinantes de resistencia a colistina	70
5.3.5.1. Ensayos de conjugación	70
5.3.5.2. Transformación mediante electroporación	72
5.3.5.2.1. Preparación de células electrocompetentes	72
5.3.5.2.2. Transformación de las células electrocompetentes	73
5.3.6. Electroforesis en campo pulsado	74
5.3.6.1. Preparación de los bloques de agarosa	74
5.3.6.2. Digestión del ADN en los bloques de agarosa	75
5.3.6.3. Preparación del gel de agarosa y electroforesis en campo pulsado	76
5.3.7. Hibridación de ácidos nucleicos mediante Southern blot ...	77
5.3.8. PCR en tiempo real	77
5.3.9. Trasplante de mutaciones por doble recombinación	78
5.4. TÉCNICAS BIOINFORMÁTICAS	79
RESULTADOS	81
6.1. Mecanismos de resistencia a colistina en un modelo <i>in vitro</i> de <i>Escherichia coli</i>	85
6.1.1. Cepario	85
6.1.2. Sensibilidad antimicrobiana	85
6.1.3. Crecimiento bacteriano	87
6.1.4. Mecanismos de resistencia a colistina	93
6.1.5. Mutagénesis dirigida de los polimorfismos encontrados	94

6.1.6.	Expresión del gen <i>pmrH</i>	95
6.1.7.	Estudio bioinformático del genoma del mutante CR4.....	95
6.1.8.	Estabilidad del genotipo.....	96
6.2.	Mecanismos de resistencia a colistina en cepas de <i>Escherichia coli</i> de origen animal	101
6.2.1.	Cepario	101
6.2.2.	Sensibilidad antimicrobiana	101
6.2.3.	Crecimiento bacteriano	101
6.2.4.	Mecanismos de resistencia a colistina	103
6.2.4.1.	Polimorfismos en el sistema <i>pmrAB</i>	103
6.2.4.2.	Genes <i>mcr</i>	103
6.2.5.	Mecanismos de resistencia a betalactámicos	105
6.2.6.	Estabilidad del genotipo	106
6.3.	Mecanismos de resistencia a colistina en cepas de <i>Salmonella enterica</i> de origen animal	111
6.3.1.	Cepario	111
6.3.2.	Sensibilidad antimicrobiana	111
6.3.3.	Crecimiento bacteriano	117
6.3.4.	Mecanismos de resistencia	120
6.3.4.1.	Polimorfismos en el sistema <i>pmrAB</i>	121
6.3.4.2.	Genes <i>mcr</i>	121
6.3.5.	Estabilidad del genotipo	122
DISCUSIÓN		127
7.1.	Modelo <i>in vitro</i> de resistencia a colistina en <i>Escherichia coli</i>	129
7.2.	Cepario de origen animal	132

7.3.	Sensibilidad antimicrobiana	133
7.4.	Crecimiento bacteriano.....	133
7.5.	Mecanismos de resistencia en cepas de origen animal	134
7.6.	Estabilidad del genotipo	137

CONCLUSIONES

139

BIBLIOGRAFÍA

143

III. ANEXOS

I. ÍNDICES Y ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tabla resumen de las categorías establecidas en veterinaria	6
Tabla 2: Tabla resumen de los antimicrobianos de importancia médica	6
Tabla 3: Tabla resumen de los genes amplificados, cebadores utilizados y condiciones de PCR y tamaño del amplicón esperado en pb	68
Tabla 4: Tabla resumen de los genes plasmídicos amplificados, cebadores utilizados y condiciones de PCR y tamaño del amplicón esperado en pb	68
Tabla 5: Tabla resumen de los genes cromosómicos amplificados, cebadores utilizados y condiciones de PCR y tamaño del amplicón esperado expresado en pb	69
Tabla 6: Tabla resumen de los genes cuantificados por qPCR en <i>Escherichia coli</i> .	78
Tabla 7: Tabla resumen de los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos <i>FullAB</i> y <i>BM2FR</i>	78
Tabla 8: Concentración mínima inhibitoria para la colistina y la polimixina B en los mutantes espontáneos e independientes resistentes a colistina procedentes de la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	85
Tabla 9: Tiempo de generación, expresado en minutos, de los mutantes, en presencia y ausencia de colistina, y de la cepa “madre” de la que proceden, en ausencia de colistina	93
Tabla 10: Polimorfismos encontrados en el sistema <i>pmrAB</i> en los mutantes espontáneos resistentes a colistina.	94
Tabla 11: Polimorfismos transferidos por doble recombinación y CMI de colistina.	94
Tabla 12: Resumen del análisis bioinformático del mutante CR4 comparado con la cepa de referencia <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cronograma representativo de las fechas más importantes en la historia de la colistina.....	7
Figura 2: Evolución del consumo de antibióticos del grupo J01 en España desde el año 2012 al 2016 en el ámbito hospitalario	9
Figura 3: Representación gráfica de la evolución del consumo de colistina en hospitales en el período 2012 a 2017	9
Figura 4: Evolución del consumo total de antibióticos veterinarios en todas las especies productoras de alimentos en mg/PCU.....	11
Figura 5: Evolución del consumo de colistina en mg/PCU	12
Figura 6: Evolución del consumo de colistina, neomicina y apramicina en mg/PCU	13
Figura 7: Estructura química de la polimixina B y la polimixina E (colistina).....	15
Figura 8: Estructura de la membrana externa de las bacterias Gram negativas	16
Figura 9: Estructura del lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas.....	17
Figura 10: Mecanismo de acción de las polimixinas.	22
Figura 11: Representación gráfica de los mecanismos de resistencia a colistina de naturaleza cromosómica en <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enterica</i>	29
Figura 12: Representación gráfica de la presencia del gen <i>mcr-1</i> en el mundo	31
Figura 13: Distribución del gen <i>mcr-2</i> en el mundo	32
Figura 14: Distribución del gen <i>mcr-3</i> en el mundo.	33
Figura 15: Distribución del gen <i>mcr-4</i> en el mundo	34
Figura 16: Distribución del gen <i>mcr-5</i> en el mundo	35
Figura 17: Distribución del gen <i>mcr-6</i> en el mundo	36
Figura 18: Distribución del gen <i>mcr-7</i> en el mundo	37
Figura 19: Distribución de <i>mcr-8</i> en el mundo	37
Figura 20: Esquema de trabajo llevado a cabo para el estudio de las cepas bacterianas incluidas en este estudio de investigación	52
Figura 21: Representación gráfica del modelo de selección <i>in vitro</i> de mutantes espontáneos independientes resistentes a colistina de la cepa de colección ATCC 25922.....	56
Figura 22: Representación gráfica del experimento para determinar la estabilidad del fenotipo bacteriano.	64

Figura 23: E- test de colistina realizado a los mutantes espontáneos resistentes a colistina (CR 1- CR 10)	86
Figura 24: Curvas de crecimiento de los mutantes espontáneos resistentes a colistina	88
Figura 25: Representación gráfica de la sobreexpresión relativa del gen <i>pmrH</i> con respecto al gen <i>recA</i> en los mutantes espontáneos resistentes a colistina seleccionados <i>in vitro</i>	95
Figura 26: Representación gráfica de la estabilidad del genotipo de los mutantes espontáneos resistentes a colistina.....	97
Figura 27: Representación gráfica del crecimiento bacteriano de las cepas Eco 1, Eco 9, Eco 36, Eco 37, Eco 46 y Eco 92 en medio LB en presencia de colistina, a una concentración de 2mg/L y sin antibiótico.....	102
Figura 28: Campo pulsante e hibridación de las membranas con sondas para los genes <i>mcr-1</i> y <i>mcr-3</i>	104
Figura 29: Estabilidad de cepas de <i>Escherichia coli</i> presentes en la Categoría A....	107
Figura 30: Estabilidad de las cepas de <i>Escherichia coli</i> presentes en la categoría B.	107
Figura 31: Fotografía de los E-test realizados a las cepas de <i>Salmonella enterica</i> que conforman la colección.....	112
Figura 32: Representación gráfica del PAP de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> resistentes a colistina	116
Figura 33: Crecimiento de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> resistentes a colistina.	120
Figura 34: Estabilidad de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> pertenecientes a la categoría A.....	123
Figura 35: Estabilidad de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> pertenecientes a la categoría B.....	124
Figura 36: Estabilidad de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> pertenecientes a la categoría C.	126

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ANI: Average Nucleotide Identity

ARN: Ácido ribonucleico

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CSB: Cell Suspension Buffer

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMA: European Medicines Agency

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ISO: International Organization Standardization (Organización Internacional de Estandarización)

ITACyL: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León

JIA CRA: Joint Inter-agency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis

Kdo: Ácido 2-keto-3-deoxioctanato

Kb: Kilobases

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

mg/PCU: mg de principio activo por unidad de corrección de población

MH: Medio de cultivo Mueller Hinton

OMS: Organización Mundial de la Salud

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

PAP: Perfil del análisis de la población (Population Analysis Profiling).

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PFGE: Electroforesis en campo pulsado (Pulse-Field Gel Electrophoresis)

PRAN: Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de diseminación de resistencias a los antibióticos.

qPCR: PCR en tiempo real

RAST: Rapid Annotations using Subsystems Technology

rpm : revoluciones por minuto

STAB: Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia

TBE: Tris-Borato-EDTA

TCS: Sistema de doble componente

TE: Tris HCl, EDTA

UFC: Unidades formadoras de colonia

VISAVET: Servicio de Vigilancia Sanitaria Veterinaria

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación actual sobre la resistencia bacteriana a los antimicrobianos

Sin duda, uno de los mayores hallazgos en la historia de la medicina ha sido el descubrimiento de los antibióticos. En 1928 Fleming descubrió la primera sustancia con propiedades antimicrobianas, la penicilina. Posteriormente han sido muchos los compuestos con propiedades antimicrobianas, los cuales se han empleado tanto en medicina humana como en medicina veterinaria.

Junto con el uso de antimicrobianos, el desarrollo de resistencias a los mismos ha ido en paralelo, ya que tras el descubrimiento de los primeros antibióticos comenzaron a surgir los primeros problemas de resistencia, en un período temporal generalmente corto. Como por ejemplo la aparición de la resistencia a penicilina en cepas de *Staphylococcus aureus* debido a la producción de beta-lactamasas a finales de los años 50 (Abraham y Chain, 1988). Posteriormente se detectó un incremento de resistencias antimicrobianas acentuándose cada vez más en la actualidad, e incluso algunos investigadores argumentan que nos encontramos en el inicio de la era pos antibiótica (Prescott, 2006).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el término de resistencia a un antimicrobiano, o farmacorresistencia, se aplica cuando una población bacteriana es capaz de crecer ante la presencia del mismo, o bien cuando sólo se consigue inhibir el crecimiento de la misma utilizando concentraciones superiores a las que se puede utilizar de forma terapéutica para resolver una infección, haciendo que estos no sean eficaces. Actualmente la aparición de bacterias resistentes a los antimicrobianos se ha convertido en uno de los grandes retos para la Medicina Humana y Animal, y una amenaza para la Salud Pública a nivel mundial.

Las causas que favorecen la aparición de las resistencias bacterianas son muchas. Dado que los antimicrobianos ejercen presiones selectivas sobre las poblaciones bacterianas, la aparición y selección de resistencias antimicrobianas se ven favorecidas por el uso de los mismos. Por un lado existen numerosos estudios que han demostrado la relación entre el abuso o uso inadecuado de antimicrobianos en animales y el incremento de resistencias en bacterias patógenas humanas y animales (Mellon *et al.*, 2001; Neu, 1992). Aunque la aparición de los mecanismos

de resistencia tienen su origen también en la excesiva dispensación de antibióticos y su uso deficiente en pacientes humanos.

Como consecuencia de esta problemática surge la Iniciativa Una Salud (*One Health Initiative*), un movimiento basado en la agrupación y coordinación de distintas profesiones sanitarias, destacando la medicina humana y veterinaria y las disciplinas dedicadas a la preservación del medio ambiente, para hacer frente a enfermedades de carácter zoonótico, dentro de las que destacan las producidas por bacterias resistentes. En 2014 la Agencia Española de Medicamentos y productos Sanitarios (AEMPS) aprobó el *Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de diseminación de resistencias a los antibióticos*, con el objetivo de afrontar uno de los grandes problemas de la Salud Pública y la Sanidad Animal. Dentro de la línea estratégica de *Vigilancia del consumo de antibióticos y de las resistencias a los antimicrobianos* destaca una medida: controlar el uso de antibióticos críticos, identificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como los antibióticos indispensables para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes en personas, limitando su prescripción en el ámbito de la salud animal.

Las resistencias a los antibióticos están codificadas en genes, los cuales pueden existir tanto en el cromosoma bacteriano como en elementos genéticos transferibles: plásmidos, transposones o intrones. Además la resistencia puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca o natural es la ausencia de sensibilidad natural que presentan algunas bacterias hacia algunos antibióticos, debido principalmente a la falta de las dianas terapéuticas sobre las que actúan los antibióticos, como por ejemplo la resistencia natural que presenta *Mycoplasma* a los betalactámicos al carecer de pared celular (Bébéar y Pereyre, 2005).

Por otro lado, la resistencia ambiental se manifiesta en función de factores físico-químicos del medio, que hace que un antibiótico no sea activo frente a un microorganismo en determinadas condiciones ambientales. La resistencia adquirida es aquella que surge como consecuencia de variaciones inducidas en la dotación genética de los microorganismos. La adquisición de resistencias en bacterias se debe principalmente a la aparición de mutaciones cromosómicas y al intercambio de genes (García y García, 1997).

1.2. Tratamiento de infecciones bacterianas producidas por bacterias multirresistentes. Antibióticos de importancia crítica en medicina humana

El futuro tratamiento, tanto de personas como animales, de infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes radica en aplicar los resultados obtenidos en investigaciones enfocadas en el estudio de los mecanismos de resistencia bacterianos frente a antibióticos, y en especial aquellos que son de última opción terapéutica, gracias a ello podremos desarrollar herramientas, terapéuticas y preventivas, así como de gestión y legislativas que nos permitan combatir las infecciones bacterianas producidas por bacterias multirresistentes.

Debido a la escasez de desarrollo de nuevos antibióticos el uso racional de los mismos se convierte en la una herramienta imprescindible para combatir la aparición y diseminación de resistencias a los antimicrobianos. Por ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), como respuesta al impacto de las resistencias antimicrobianas sobre la Salud Pública y la Sanidad Animal, realizó una categorización de los antibióticos en función de la recomendación de su uso en los ámbitos humano y animal (Tabla 1).

En 2005 la OMS estableció por primera vez la lista de antimicrobianos de importancia crítica en medicina humana, con el objetivo de gestionar las resistencias a antimicrobianos y garantizar que todos los antimicrobianos, y en especial los de importancia crítica para la salud pública, se utilicen de forma prudente.

En esta lista se establecen tres categorías en función de la importancia para la medicina humana: de importancia crítica (donde se establecen dos categorías: de máxima prioridad y de gran prioridad), muy importantes e importantes (Tabla 2).

CATEGORÍA	ANTIBIÓTICOS	MANEJO DEL RIESGO
Categoría 1. Menos riesgo para la salud pública	Penicilinas de espectro estrecho, macrólidos, tetraciclinas, rifampicinas	Principios generales de uso prudente
Categoría 2. Mayor riesgo para la salud	Fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, colistina, aminoglicósidos, penicilinas de espectro extendido	Uso restringido a los casos en que no exista otra alternativa
Categoría 3. No autorizados para uso en animales	Carbapenemas, fosfomicina, cefalosporinas de última generación, glicopéptidos, gliciliclinas, lipopéptidos, monobactams, oxazolidinonas, riminofenazinas, sulfonas, tratamientos para la tuberculosis y otras micobacterias	Uso restringido a casos excepcionales en pequeños animales, en cascada.
Categoría 0. No incluidos en las categorías 1, 2 y 3	Cefalosporinas de 2ª generación, sulfamidas, lincosamidas, nitroimidazoles, fenicoles y otros	Estos antimicrobianos están siendo valorados. Son de primera elección, pero se usan con las mismas restricciones que los de la categoría 1. No se pueden usar sin precauciones.

Tabla 1: Tabla resumen de las categorías establecidas en veterinaria. (Adaptación de la OMS, 2017).

	ANTIMICROBIANO
	MÁXIMA PRIORIDAD
	Cefalosporinas (de tercera, cuarta y quinta generación), glicopéptidos, macrólidos y cetólidos, polimixinas y quinolonas.
	GRAN PRIORIDAD
DE IMPORTANCIA CRÍTICA	Aminoglucósidos, ansamicinas, carbapenémicos y otros penémicos, gliciliclinas, lipopéptidos, monobactámicos, oxazolidinonas, penicilinas (naturales, aminopenicilinas y antipseudomonales), derivados del ácido fosfónico y fármacos utilizados únicamente para tratar la tuberculosis u otras enfermedades micobacterianas.
MUY IMPORTANTES	Aminopenicilinas, anfenicoles, cefalosporinas (de primera y segunda generación) y cefamicinas, lincosamidas, penicilinas (antiestafilocócicas), ácidos pseudomónicos, riminofenazinas, antibacterianos esteroideos, estreptograminas, sulfonamidas, inhibidores de la dihidrofolato-reductasa y combinaciones, sulfonas y tetraciclinas.
IMPORTANTES	Aminociclitolos, polipéptidos cíclicos, nitrofurantoínas, nitroimidazoles y pleuromutilinas.

Tabla 2: Tabla resumen de los antimicrobianos de importancia médica. (Adaptación de la OMS, 2017)

1.3. Colistina

La propiedad antibiótica de las polimixinas fue reconocida por primera vez en los años cuarenta (Ainsworth *et al.*, 1947; Benedict y Langlykke, 1947; Stansly *et al.*, 1947), un grupo antimicrobiano con actividad frente a la mayoría de bacterias Gram negativas. En 1947, se descubrió el primer miembro de la familia, la polimixina B (Ainsworth *et al.*, 1947; Stansly *et al.*, 1947).

La colistina, también denominada como polimixina E, es un antibiótico de naturaleza polipeptídica que fue aislado en 1950 de una bacteria que normalmente habita en los suelos: *Paenibacillus polymixa* subespecie *colistinus* (Figura 1) (Koyama *et al.*, 1953). Tanto la polimixina B como la colistina son metabolitos secundarios peptídicos no ribosomales producidos por dicha bacteria.

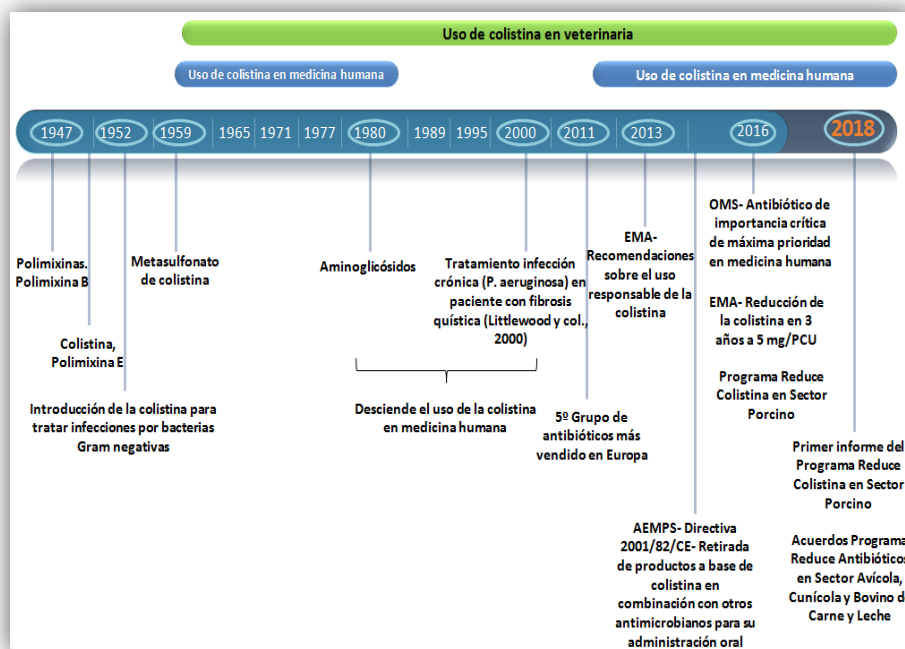


Figura 1: Cronograma representativo de las fechas más importantes en la historia de la colistina.

1.3.1. **Uso de colistina en medicina humana**

En 1952, dos años tras su descubrimiento, la colistina fue introducida para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram negativas, aunque no fue hasta 1959, cuando se obtiene el metasulfonato de colistina (un compuesto inactivo

y de menor toxicidad), que es introducida de forma habitual en clínica. Su uso se extendió hasta principios de los años 80, donde fue sustituida por otros antimicrobianos de menor toxicidad, los aminoglicósidos. A partir de ese momento su uso descendió hasta principios del siglo XXI, cuando comenzó a replantearse su uso hospitalario para el tratamiento de infecciones bacterianas por Gram negativos, tras la descripción de la curación mediante la colistina de una infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa* en un paciente con fibrosis quística, en el año 2000, por Littlewood y colaboradores.

Desde el año 2005 la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece una relación de los antibióticos utilizados en medicina humana, que en la mayoría de los casos son utilizados también en medicina veterinaria, agrupándolos en tres categorías en función de su importancia para la medicina humana: antibióticos importantes, antibióticos muy importantes y antibióticos de importancia crítica, dentro de estos últimos se establecen dos categorías: de máxima prioridad y de gran prioridad. Antiguamente las polimixinas se encontraban en la categoría de antibióticos muy importantes pero en octubre de 2016, el Grupo Consultivo sobre Vigilancia Integrada de la Resistencia a los Antimicrobianos en su quinta revisión de la lista OMS de antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana las categorizó como antibiótico de importancia crítica de máxima prioridad para la medicina humana, al tratarse de uno de los pocos tratamientos existentes para combatir las infecciones producidas por bacterias Gram negativas. Este hecho hizo que en veterinaria, las polimixinas, y en especial la colistina, se incluyeran en la categoría 2, restringiendo su uso a casos en los que no exista otra alternativa.

Según el informe JIACRA (Joint Inter-agency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis) el uso de antibióticos en el ámbito hospitalario, dentro de los que se encuentra la colistina, ha aumentado un 9.5 % de 2012 a 2016 (Figura 2).

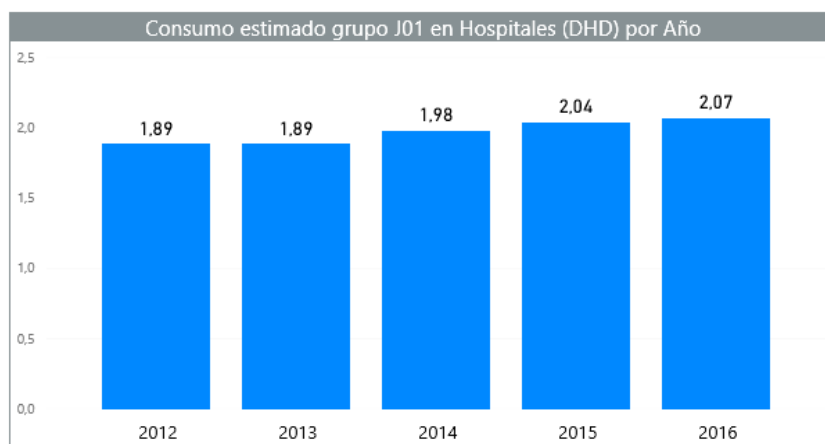


Figura 2: Evolución del consumo de antibióticos del grupo J01 en España desde el año 2012 al 2016 en el ámbito hospitalario (Informe JIACRA, 2018)

Este incremento se debe principalmente al aumento de resistencias bacterianas en ámbito hospitalario. Aunque la mayor parte de consumo de antibióticos corresponde a antibióticos betalactámicos (en torno al 61,49 %), se observa una tendencia ascendente en el uso de las polimixinas, y en especial de la colistina, apreciándose un consumo del 9,66 % del total de antibióticos consumidos en ámbito hospitalario (Figura 3).

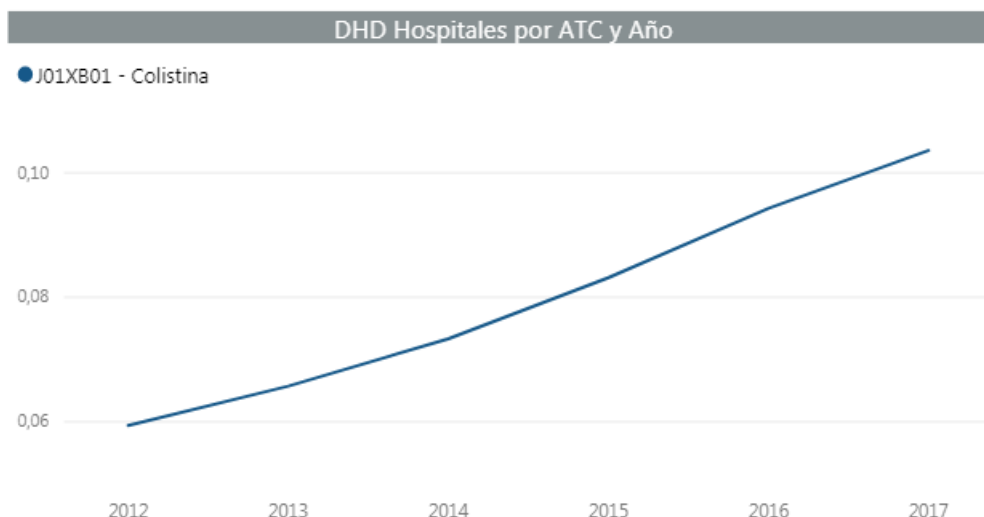


Figura 3: Representación gráfica de la evolución del consumo de colistina en hospitales en el período 2012 a 2017 (AEMPS, 2018).

1.3.1.1. Toxicidad de las polimixinas

Debido a que las polimixinas han sido reintroducidas en la batería terapéutica clínica 50 años después de su descubrimiento, nunca han estado sometidas al proceso de aprobación existente para el desarrollo de fármacos, que actualmente es requerido por las distintas autoridades internacionales reguladoras de medicamentos. Además, hay que destacar que actualmente se desconoce el mecanismo molecular exacto de toxicidad. Por estos motivos, se conoce poco sobre la farmacocinética y farmacodinámica de este antibiótico, hecho que impide maximizar el poder antibacteriano de las polimixinas, controlar su toxicidad y evitar el desarrollo de resistencias antimicrobianas (Luque *et al.*, 2011).

El espectro antibacteriano de la colistina es estrecho. Además, los efectos adversos relacionados con su administración parenteral, su nefrotoxicidad y neurotoxicidad principalmente, hicieron que durante años se limitara su uso a presentaciones tópicas y oftalmológicas.

Dentro de los efectos secundarios de la administración de colistina, la nefrotoxicidad es más frecuente que la neurotoxicidad. El grado de neurotoxicidad y nefrotoxicidad es dosis dependiente, y normalmente reversible (Ordooei *et al.*, 2015; Sorlí *et al.*, 2013). La aparición de la misma está influida por diversos factores de riesgo, como son la administración conjunta con otros medicamentos, como antiinflamatorios, vancomicina o aminoglicósidos; así como factores dependientes de los pacientes, como la edad, sexo, presencia de hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia, presencia de enfermedades renales y grado de enfermedad. La aparición de los efectos nefrotóxicos es rápida, apareciendo en la mayoría de los casos a la semana de tratamiento, y siendo en la mayoría de los casos reversible. El porcentaje de casos de fallo renal originados por la toxicidad de este antibiótico varía entre el 6 y el 55%, debido en gran parte a las discrepancias existentes a la hora de definir la enfermedad renal, así como las dosis utilizadas, la co-administración con otros medicamentos y la existencia o no de la monitorización de la función renal al aplicar el tratamiento (Yahav *et al.*, 2012).

Por otro lado, debido a su neurotoxicidad, puede ocasionar sintomatología nerviosa como: parestesia facial y periférica, debilidad, mareos/ vértigo, perturbaciones visuales, confusión, ataxia, bloqueo neuromuscular e incluso dificultades

respiratorias o apnea. El síntoma nervioso que aparece con mayor frecuencia en los pacientes, en un 27% aproximadamente, es la parestesia (Falagas y Kasiakou, 2005).

1. 3. 2. Uso de colistina en medicina veterinaria

Al contrario que en medicina humana, en medicina veterinaria la colistina ha sido muy utilizada durante décadas para el tratamiento y prevención de patologías infecciosas gastrointestinales. El consumo de colistina en medicina veterinaria se realiza principalmente mediante la administración oral del antibiótico, el cual puede presentarse en premezclas con otros antibióticos, polvo o solución oral. Su uso principal está relacionado con el tratamiento de infecciones gastrointestinales ocasionadas por cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, destacando las producidas por *Escherichia coli*, en sistemas intensivos de producción de porcino y avicultura. Además, antiguamente fue utilizado como promotor del crecimiento a nivel mundial (Catry *et al.*, 2015).

En 2011, las polimixinas representaron el quinto grupo de antibióticos más vendidos (constituyendo un 7% de las ventas totales de antibióticos) para el tratamiento de animales de producción en Europa (Catry *et al.*, 2015).

En el año 2014, según el informe del proyecto “European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption”, España fue el país europeo con mayor consumo de antibióticos veterinario (Figura 4). Con respecto a la colistina presentó los mayores niveles de consumo de colistina con 37 mg/PCU (Figura 5).

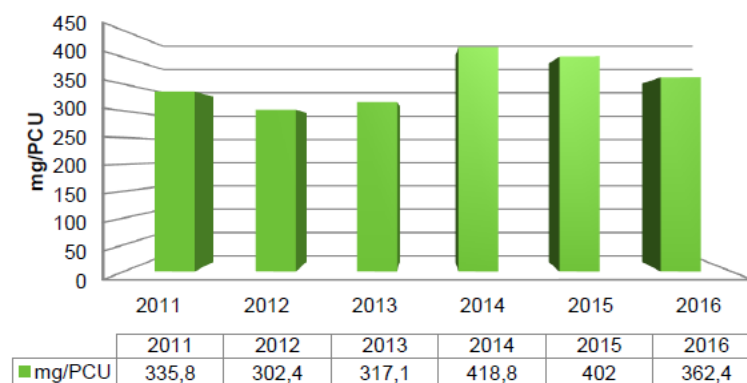


Figura 4: Evolución del consumo total de antibióticos veterinarios en todas las especies productoras de alimentos en mg/PCU (Informe JIACRA, 2018).

A pesar de su amplio uso en medicina veterinaria, la tasa de cepas de *E. coli* resistentes a colistina en animales sanos es inferior al 1% en la mayoría de los países europeos (Kempf *et al.*, 2013). Sin embargo, este dato de resistencia cambia cuando hablamos de animales enfermos, en los cuales la frecuencia de *E. coli* resistentes es mayor (en torno al 10% en cepas de *E. coli* procedentes de cerdos enfermos en Bélgica) (Boyen *et al.*, 2010). Además, recientemente se ha descrito la emergente aparición de resistencia a colistina en cepas de origen bovino (Hernández *et al.*, 2018; Kieffer *et al.*, 2015).

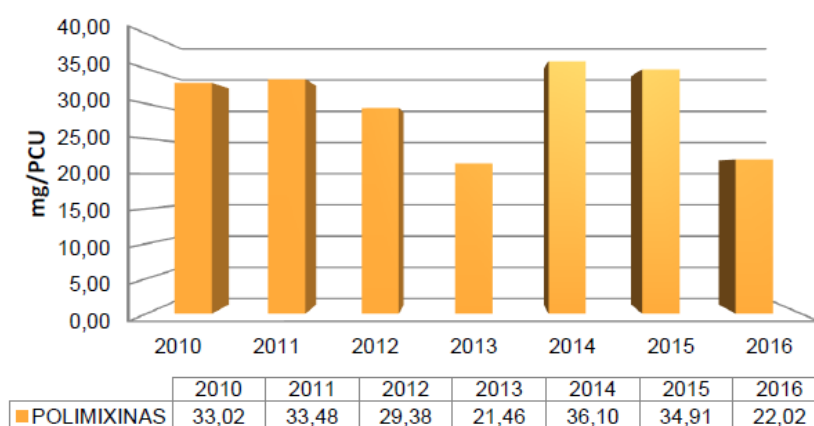


Figura 5: Evolución del consumo de colistina en mg/PCU (Informe JIACRA).

Debido al incremento de las infecciones producidas por bacterias multirresistentes en medicina humana, y a la reciente aparición de diversos mecanismos de resistencia de transferencia horizontal mediante plásmidos en cepas de *Enterobacteriaceae*, el uso de la colistina en medicina veterinaria ha sido reevaluado.

En China el Ministerio de Agricultura ha decidido prohibir el uso de colistina como aditivo para alimentación animal. Por otro lado, en 2013, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, European Medicines Agency), recomendó realizar un uso responsable de la colistina en animales y limitar su uso en animales enfermos y nunca como profiláctico o preventivo. Unos años más tarde, en junio de 2016, la EMA estableció unas directrices en las que asesora sobre el uso de colistina, y productos que la contienen, en animales dentro de la Unión Europea. Así mismo estableció un umbral máximo de 5 mg/PCU de colistina en la Unión Europea, que

deberán alcanzar los estados miembros en un plazo de tres años, es decir, a finales de 2019; siendo deseable llegar a 1 mg/PCU (EMA, 2016).

En base a estas indicaciones, en 2015, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) comunicó la retirada de todos los medicamentos veterinarios a base de colistina en combinación con otros antimicrobianos para su administración oral, cumpliendo así con la Decisión de Ejecución de la Comisión Europea que adoptó bajo el marco del artículo 35 de la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (AEMPS, 2015).

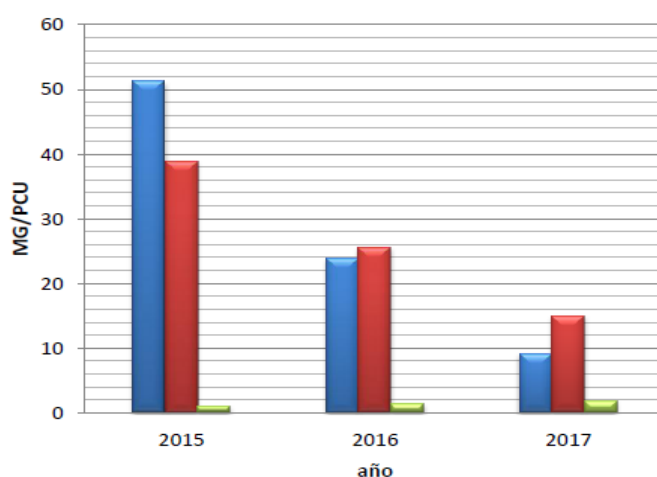


Figura 6: Evolución del consumo de colistina, neomicina y apramicina en mg/PCU. Donde el color azul representa la colistina, el color rojo a la neomicina y el color verde a la apramicina (AEMPS, 2017).

Así mismo, en 2016, la AEMPS se reunió con representantes de las asociaciones nacionales de veterinarios y profesionales del sector porcino, con el objetivo de elaborar un acuerdo para reducir el consumo de colistina. De esta reunión nace el Acuerdo para la Reducción Voluntaria del Consumo de Colistina en el Sector Porcino, también conocido como el “Programa Reduce Colistina”, cuyo objetivo principal es reducir el consumo de colistina en producción porcina, hasta llegar a 5 mg/PCU en el plazo de tres años. Además, el programa tiene como objetivo controlar el consumo de otros antibióticos, como la neomicina y/o la apramicina, como posible sustitución a la colistina. En 2018 se han publicado los resultados obtenidos en los años 2016 y 2017. Con la aplicación de este programa, en el que han participado 44 empresas que representan el 77% de la producción de porcino nacional, se ha observado la disminución del consumo en un 82,37% desde el 2015 al 2017, pasando de un consumo de 51,09 mg/PCU a 9 mg/PCU (Figura 6)

Teniendo en cuenta el éxito del “Programa Reduce Colistina” y tras la evaluación pertinente del resto de sistemas de producción, el “Programa Reduce Antibióticos” ha acordado la creación de acuerdos de colaboración para reducir el uso de medicamentos y fomentar su uso prudente con los representantes de los sectores cunícola, avícola y bovino de carne y leche. Uno de los acuerdos más representativos es el fijado con la Organización Interprofesional de la Avicultura de Carne de Pollo de España en el que ha acordado la reducción del uso de antibióticos en un 45%, y en el caso concreto de la colistina se ha acordado una disminución del 80%, pasando de una concentración de 4,7 mg/Kg, utilizados actualmente (en 2018) a 1 mg/Kg para el año 2020. Por otro lado, cabe destacar el compromiso en el sector de vacuno de carne (y en concreto de la Asociación Española de Productores de Vacuno de Carne) en el que se comprometen a eliminar el uso de piensos con antibióticos para el año 2020.

1.3.3. Naturaleza química de las polimixinas

El grupo antimicrobiano de las polimixinas está compuesto por las polimixinas A-E, de las cuales solo la polimixina B y la polimixina E (ó colistina) están disponibles en el mercado. La estructura química de las polimixinas presenta algunas semejanzas con los péptidos catiónicos antimicrobianos (entre los que se encuentran defensinas y gramidinas), los cuales representan la primera línea de defensa utilizada por las células eucariotas cuando son colonizadas por bacterias (Hancock, 1999).

Las polimixinas son polipéptidos catiónicos que consisten en un heptapéptido cíclico que posee una cadena lateral tripéptida acilada en el extremo N por una cola de ácidos grasos. (Falagas *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006). Este N terminal acilado con un ácido graso confiere a la colistina sus propiedades hidrofóbicas, siendo probablemente el responsable de su toxicidad y, además, de su actividad antimicrobiana (Brink *et al.*, 2014; Gallardo-Godoy *et al.*, 2016).

La colistina y la polimixina B difieren solo en un aminoácido en el anillo peptídico, fenilalanina en la polimixina B y leucina en la colistina (Nation *et al.*, 2014). Esta diferencia hace que la forma en la que se administra, como forma activa o como prodroga inactiva, sea distinta en función de si se trata de polimixina B o colistina, respectivamente.

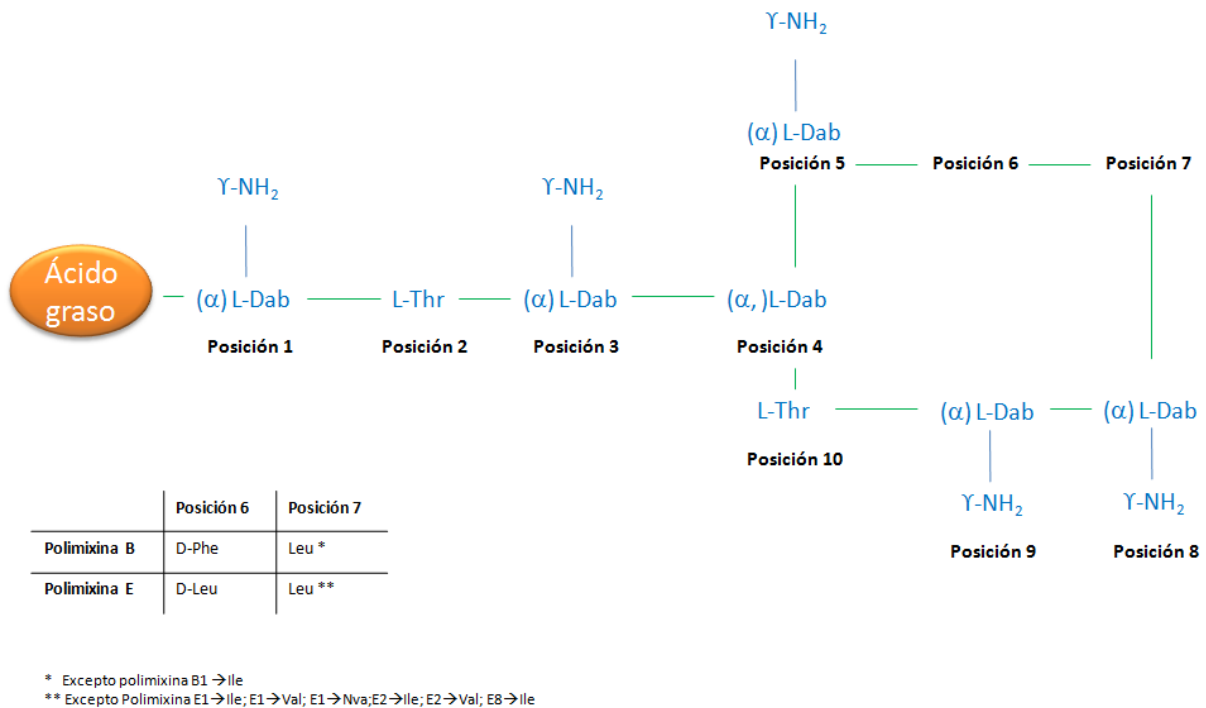


Figura 7: Estructura química de la polimixina B y la polimixina E (colistina).

1. 4. Envuelta celular de las bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas se caracterizan principalmente por la composición y estructura de la pared celular, en la que destaca la presencia de la membrana externa, la cual actúa como una barrera de paso para una gran cantidad de sustancias, entre las que se incluyen los antimicrobianos (Figura 8).

En primer lugar, cabe destacar que la pared celular de las bacterias Gram negativas es más compleja, tanto en su composición como en su estructura en comparación con la de las bacterias Gram positivas. Esta pared celular está compuesta por una membrana externa, una capa de peptidoglicano, el cual representa una pequeña porción de la pared (alrededor del 10%) y una membrana interna o membrana citoplasmática. La membrana externa posee una capa interna, de naturaleza fosfolipídica y una capa externa, caracterizada por la presencia del lipopolisacárido (LPS), además de proteínas de naturaleza distinta a las presentes en la membrana interna (Costerton *et al.*, 1974).

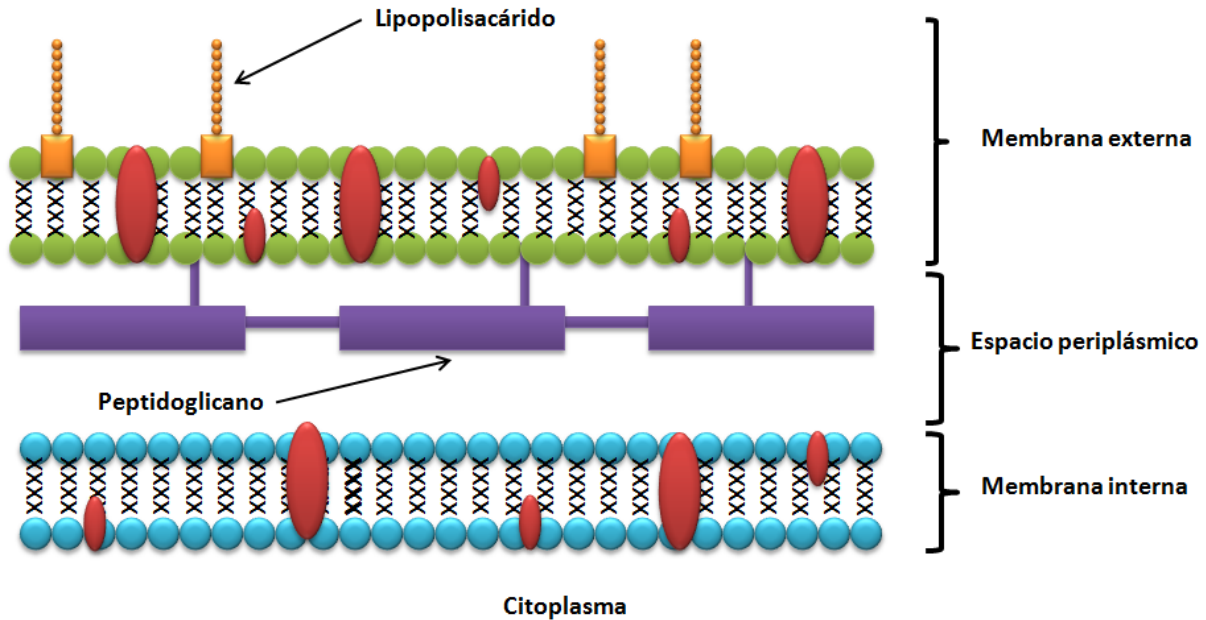


Figura 8: Estructura de la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

La presencia de una membrana ubicada externamente al peptidoglicano es la característica más reseñable de las bacterias Gram negativas. Esta membrana es denominada como membrana externa. En la zona más externa de dicha membrana se localiza el LPS, el cual está anclado a una bicapa fosfolipídica en la que flotan algunas lipoproteínas. Porinas, y otras proteínas de naturaleza similar, hacen posible que la membrana externa actúe como un “filtro molecular” al permitir el paso a través de la pared celular y la membrana citoplasmática de algunas moléculas, incluyendo los antimicrobianos. Por otro lado, la membrana externa es responsable del contacto de la bacteria con el medio externo, al facilitar estructuras y receptores relacionados con la adherencia a las células del hospedador, con la resistencia a la fagocitosis y la sensibilidad a los bacteriófagos. Dentro de los elementos de interacción de la bacteria con el hospedador destacamos el lipopolisacárido. (Beveridge, 1999), que consta de tres regiones o dominios: el polisacárido O, el núcleo polisacarídico o core y el lípido A.

un disacárido de glucosamina unido por un enlace beta-1'-6, esterificado en cuatro posiciones con ácidos grasos saturados y fosforilado en los extremos 1' y 4', y se comporta como un mitógeno de células B. Es un elemento tóxico para algunas células del hospedador y contribuye a la activación del complemento por la vía alternativa. Su principal actividad es provocar la sepsis en el hospedador (Kruglov *et al.*, 2015).

Para comprender el mecanismo de acción de la colistina es necesario saber que existen dos cationes divalentes, Mg^{2+} y Ca^{2+} , asociados a los fosfoésteres del lípido A, los cuales tienen un papel estructural muy importante ya que coordinan y estabilizan moléculas de LPS contiguas. Es así como la membrana externa de la bacteria Gram negativa se configura no sólo como una barrera mecánica, sino también electrostática, al poseer una elevada carga aniónica conferida por las fracciones fosfoéster del lípido A, así como por los fosfatos y carboxilatos de los azúcares de las otras regiones del LPS, el core y el antígeno O (Hancock, 1999).

1.4.1. Biosíntesis del lipopolisacárido

La complejidad del LPS de las bacterias Gram negativas queda reflejada en el proceso de biosíntesis y exportación, los cuales ocurren en varios compartimentos con la participación de un gran número de funciones celulares.

El primer paso para la biosíntesis del LPS consiste en la acilación de una molécula de N-acetil glucosamina activada con difosfato de uridina (UDP-GlcNAc) con una molécula de ácido β -hidroximirístico. Este paso es llevado a cabo por una aciltransferasa que está codificada por el gen *lpxA*. Posteriormente se produce la acilación del monosacárido dando lugar a una molécula precursora denominada como lípido X. Esta acción es realizada por los productos de los genes *lpxC* y *lpxD*. Seguidamente el producto del gen *lpxB* cataliza la reacción de condensación del lípido X con un derivado activado del lípido X (UDP-2,3 diacil-GlcN) produciendo un precursor disacárido con cuatro grupos acilo, denominado como lípido IV_A. Al lípido IV_A se le añaden dos unidades de ácido 2-keto-3-deoxioctanato (Kdo) formando Kdo₂-IV_A, el cual es acilado completamente en las posiciones 2' y 3' del disacárido, formando así la endotoxina Re. La síntesis de Kdo se inicia con la condensación de arabinosa-5-fosfato con fosfoenolpiruvato, proceso en el cual está implicado el gen

kdsA. Seguidamente el Kdo sintetizado es activado a Kdo-CMP (monofosfato de citidina). Por otro lado los genes del grupo *rfa* codifican glicosiltransferasas y otras enzimas que añaden grupos funcionales a diversas regiones del núcleo (Schnaitman y Klena, 1993).

La cadena del polisacárido O es sintetizada independientemente del lípido A y del núcleo. Es ensamblado como un polímero unido a un lípido de membrana y transferido posteriormente a la glucosa terminal no reductora del núcleo completo. La formación cíclica de las unidades que componen el polímero requiere dos moléculas de bactoprenol pirofosfato, molécula esencial para la síntesis del peptidoglicano bacteriano. En la síntesis del polisacárido O están implicados los genes del grupo *rfa* y *rfb* (Pradel *et al.*, 1992; Schnaitman y Klena, 1993).

1.4.1.1. Decoración del lipopolisacárido en *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*

Como estrategia de defensa las bacterias decoran el LPS con distintas moléculas como cadenas acilo, aminoarabinosa y fosfoetanolamina, que protegen la carga negativa de los grupos carboxilo y fosforilo del LPS impidiendo así la unión de algunos antimicrobianos (Anaya-López *et al.*, 2013).

En cepas de ***Salmonella enterica***, PmrA/PmrB, es un sistema de doble componente (TCS) en el que PmrA es el gen regulador que responde al sensor PmrB. PmrA se activa, al fosforilarse, cuando PmrB detecta altas concentraciones de Fe^{3+} (Wösten *et al.*, 2000) y/o un pH ligeramente ácido (Pérez y Groisman, 2007) en el espacio periplásmico, o cuando un sensor no constitutivo, PhoQ, es activado por señales específicas como una baja concentración de Mg^{2+} en el espacio periplásmico. La estimulación de PhoQ produce la fosforilación de su regulador, PhoP, el cual activa la transcripción del gen *pmrD*. La activación de la proteína PmrD estabiliza la forma fosforilada de PmrA, activándola (Kato y Groisman, 2004). Esto quiere decir que la transcripción de genes activados por PmrA es más rápida cuando la señal inductora es un incremento de Fe^{3+} , o un pH ligeramente ácido, que cuando la señal inductora es una baja concentración de Mg^{2+} .

Normalmente, la adición de L-4AraN se produce en el grupo 4'- fosfato del lípido A del LPS, mientras que la adición de PEtN se produce en el grupo 1-fosfato del lípido

A. Sin embargo en algunas ocasiones la adición de estos compuestos puede realizarse de forma indistinta en un grupo u otro (Lee *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2001). Estas modificaciones del LPS están codificadas por el operón *arnBCADTEF* y el gen *pmrC* (también denominado *eptA*), respectivamente. Además, en algunas ocasiones, debido a la acción del gen *cptA* se modifica el core del LPS mediante la adición de PEtN. Tanto el operón *arnBCADTEF* como los genes *pmrC* y *cptA* son regulados por el gen *pmrA* (Tamayo *et al.*, 2005). Con respecto a la resistencia a polimixinas, la modificación del LPS con L-4AraN confiere mayor resistencia que la modificación producida al incorporar el PEtN (Tamayo *et al.*, 2005).

Por otro lado, el enzima LpxT fosforila el grupo 1-fosfato del lípido A del LPS formando 1-difosfato (1- PP) (Jones *et al.*, 2008; Touze *et al.*, 2008). Esta modificación incrementa la carga negativa del LPS, disminuyendo así la sensibilidad de la *Salmonella* a las polimixinas. La activación de *pmrA* produce la inhibición de *lpxT* (Herrera *et al.*, 2010) mediante la activación de la expresión del gen regulador *pmrR*, incrementando así la resistencia a colistina (Kato *et al.*, 2012). Además, la activación de PmrA promueve la transcripción de otros genes (*pbgP*, *ugd* y *pmrC*) que codifican enzimas que compiten con LpxT, disminuyendo así la carga negativa del LPS.

Cabe destacar que las cepas salvajes de *Salmonella* decoran los grupos fosfatos del lípido A tras la activación de las proteínas PmrA y PhoP por la detección de distintas señales químicas. Estas señales químicas influyen en el control de estructuras bacterianas implicadas en la síntesis de undecaprenil fosfato, una molécula esencial en el transporte de azúcares en diversas estructuras de la membrana celular (Touze *et al.*, 2008).

Por otro lado, en cepas de *Escherichia coli*, además del TCS PmrA/PmrB existen también las enzimas fosfoetanolamina transferasas (EptA, EptB y EptC) que adicionan fosfoetanolamina en regiones específicas del LPS (Klein *et al.*, 2013). Las fosfoetanolamina transferasas EptA y EptB incorporan pEtN al lípido A y al Kdo del core, respectivamente. Por otro lado, EptC cataliza la adición de pEtN a la heptosa I del LPS (Tamayo *et al.*, 2005). La proteína PmrD parece no ser funcional en *Escherichia coli*, lo que desconecta los TCS PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB en la decoración del LPS (Winfield y Groisman, 2004).

1.5. El mecanismo de acción de las polimixinas

Aunque existe una cierta controversia, el modelo más aceptado sobre el mecanismo de acción de las polimixinas indica que su diana principal es el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas. A pH fisiológico, las polimixinas se configuran como moléculas policatiónicas debido a las cargas positivas de las aminas presentes en los residuos del ácido α,γ - di-amino-butírico (Dab), en las posiciones 1, 3, 5, 8 y 9. Debido a las interacciones electrostáticas que ocurren entre el residuo Dab, cargado positivamente, y los grupos fosfatos del lípido A de la membrana externa, los cationes bivalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) son desplazados de su unión a los grupos fosfatos que conforman la membrana lipídica (Dixon y Chopra, 1986). De esta manera el lipopolisacárido (LPS) es desestabilizado y se incrementa la permeabilidad de la membrana bacteriana, dando lugar a la fuga de contenido citoplasmático, causando, finalmente, la muerte celular (Li *et al.*, 2006; Falagas y Kasiakou, 2005). Una vez desestructurado el LPS la molécula de polimixina se insertarían en la membrana externa a través de sus segmentos hidrófobos, es decir, mediante la cola de ácido graso de la posición amino-terminal y los residuos hidrófobos de la posición 6 y 7 del antibiótico. Después de insertada la molécula de polimixina, ésta condiciona el deterioro del ensamblaje de los ácidos grasos del lípido A, provocando la inestabilidad estructural de la membrana externa. Posteriormente, y mediante mecanismos desconocidos, se genera una fusión de la capa interna de la membrana externa con la capa externa de la membrana citoplasmática. Se cree que esto genera cambios en la estructura fosfolipídica y pérdida de la resistencia osmótica de la bacteria, generando así la muerte de la bacteria (Hancock y Chapple, 1999).

Otro efecto antibacteriano que presentan las polimixinas es el efecto antitoxina, ya que se unen y neutralizan la porción del lípido A del LPS (también conocido como endotoxina) (Li *et al.*, 2005). Por otro lado, las polimixinas producen la inhibición de la NADH-quinona óxido-reductasa de tipo II y por tanto de la respiración bacteriana, un efecto secundario que también contribuye a la toxicidad de estas moléculas (Deris *et al.*, 2014).

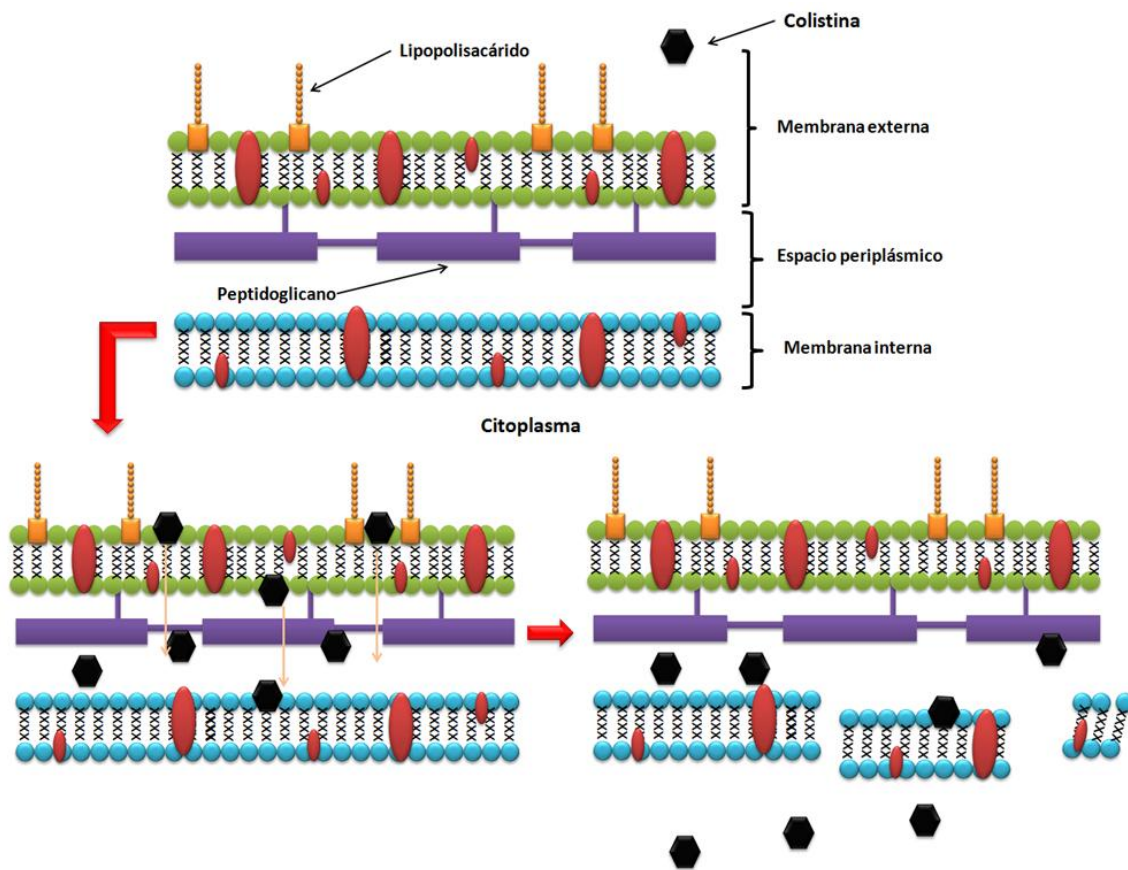


Figura 10: Mecanismo de acción de las polimixinas.

1. 5.1. Espectro de actividad y bacterias intrínsecamente resistentes

El espectro de actividad antibacteriano de las polimixinas B y E es muy similar. El espectro de la colistina es principalmente frente a la mayoría de bacterias Gram negativas. Es activa frente a la mayoría de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* Además presentan una actividad significativa frente a bacterias Gram negativas no fermentativas comunes en las infecciones intrahospitalarias como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Falagas *et al.*, 2005). Además presenta actividad frente algunas micobacterias, entre las que se incluyen *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, *mycobacterium phlei* y *Mycobacterium smegmatis* (Rastogi *et al.*, 1986; Rastogi *et al.*, 1987; Rastogi *et al.*, 1988).

Sin embargo, el espectro de la colistina no incluye *Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.* (Chiu *et al.*, 1961; Courtieu *et al.*, 1961; O'Hara *et al.*, 2000; Von Graevenitz y Nourbakhsh, 1972), *Serratia marcescens* (Lin *et al.*, 2014), *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia* (Loutet y Valvano, 2011), *Chromobacterium spp.*, *Hafnia spp.* (Jayol *et al.*, 2017), *Edwardsiella spp.* (Muyembe *et al.*, 1973), *Brucella* (Conde-Álvarez *et al.*, 2018; Kerrinnes *et al.*, 2015), *Legionella*, *Campylobacter* (Fage *et al.*, 2014; Keo *et al.*, 2011) y *Vibrio cholerae* (Bilecen *et al.*, 2015; Herrera *et al.*, 2017), las cuales son intrínsecamente resistentes a este antibiótico. Por otro lado, las polimixinas tampoco son activas frente a los cocos Gram negativos (*Neisseria spp.*, *Moraxella catarrhalis*), bacterias Gram positivas y bacterias anaeróbicas. Por todo ello, las polimixinas son consideradas antimicrobianos de reducido espectro (Falagas *et al.*, 2005).

1. 5.2. Mecanismos de resistencia a colistina

Diversos organismos establecen valores de corte que ayudan a considerar si una cepa presenta un mecanismo de resistencia frente a este antibiótico. Para establecer estos valores se tiene en cuenta la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

El CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) y la EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) han establecido el corte de susceptibilidad a colistina y polimixina B en menor, mayor o igual a 2 mg/L para *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* y como corte epidemiológico para la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, las definiciones de resistencia a colistina difieren levemente entre ambos organismos. EUCAST considera como resistente a la colistina a cualquier microorganismo con una CMI superior a 2 mg/L, mientras que el CLSI establece límites de resistencia en función del microorganismo, de tal manera que para *Acinetobacter spp.* y *Pseudomonas aeruginosa* considera resistencia a colistina a las cepas que presentan una CMI igual o superior a 4 mg/L. En el caso de las enterobacterias, valores de CMI iguales o superiores a 4 mg/L constituyen el límite epidemiológico de resistencia. Por otro lado, el CLSI establece, para algunas enterobacterias (*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella ornithinolytica*) el ECV (Epidemiological Cutoff Values) que permiten diferenciar

entre el fenotipo salvaje y el fenotipo no salvaje, dato que permite a los profesionales identificar a aquellos aislados que presentan una CMI superior al fenotipo salvaje como predisponentes a presentar mecanismos que confieren resistencia a colistina. Sin embargo, esta diferenciación fenotípica no se debe tener en cuenta desde el punto de vista clínico para aplicar un tratamiento (EUCAST, 2018).

Debido principalmente a que las polimixinas no se han utilizado en medicina humana durante décadas el método de elección para determinar la sensibilidad antimicrobiana a este grupo de antibióticos no está bien definido. Sin embargo, debido al incremento de infecciones en medicina humana producidas por bacterias resistentes a colistina, el desarrollo del método perfecto para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana se ha convertido en un gran reto para la comunidad científica. A la hora de determinar la sensibilidad a colistina son varias las dificultades encontradas. Por un lado, las características inherentes de las polimixinas, que al presentar una naturaleza catiónica pueden interferir con el medio y los materiales. Por otro lado presentan una baja difusión en agar y algunas especies bacterianas presentan heterorresistencia. Al no existir un método perfecto para determinar la sensibilidad antimicrobiana, es difícil comparar los resultados obtenidos con distintos test comerciales. Actualmente, el método de referencia propuesto tanto por el CLSI como por la EUCAST para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) es el método de microdilución en caldo establecido en la norma ISO 20776-1, siguiendo las recomendaciones propuestas por la EUCAST, en las que se establece el uso de Mueller Hinton (CA-MHB) ajustado de cationes, sin aditivos y sulfato de colistina o de polimixina B, realizando el ensayo en placas de poliestireno no tratadas anteriormente (Norma ISO 20776-1; EUCAST, 2016). Los principales inconvenientes que presenta esta técnica es su preparación manual (aunque puede automatizarse) y que la elaboración de las placas es muy laboriosa, lo que implica que puedan cometerse errores en las disoluciones de antibióticos. Por ello es de difícil ejecución en muchos laboratorios microbiológicos (Poirel *et al.*, 2017).

En alguna ocasión se han descrito casos en las que se producen un “salto” de pocillos, es decir, la ausencia de crecimiento en una de las microdiluciones, pero se observa crecimiento ante concentraciones más elevadas. Este fenómeno ha sido

descrito en *Enterobacter* (Landman *et al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (CLSI, 2014) y *Acinetobacter baumannii* (CLSI, 2012) y puede estar ligado a un fenómeno de heterorresistencia (Landman *et al.*, 2013).

Se conocen diversos mecanismos de resistencia a la colistina, entre los que se tratan a continuación aquéllos descritos en bacterias intrínsecamente resistentes así como los existentes en enterobacterias, especialmente en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.

1.5.2.1. Bacterias intrínsecamente resistentes a colistina

En *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* y *Burkholderia spp* el mecanismo de resistencia intrínseca a las polimixinas está ligado a la expresión constitutiva del operón *arnBCADTEF* y/o del gen *eptB*, los cuales causan la adición de los grupos catiónicos: fosfoetanolamina (pEtN) y/o 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) al LPS (Aquilini *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014). Esta modificación incrementa la carga positiva del LPS, principal punto de unión de las polimixinas, disminuyendo así la unión de las mismas a la bacteria e incrementando la resistencia a colistina de estas especies bacterianas.

Por otro lado en el caso de *Burkholderia spp.* se observa la predominancia de L-Ara4N en el lípido A y el core del LPS (Isshiki *et al.*, 1998; Novem *et al.*, 2009; Silipo *et al.*, 2005). La producción de este azúcar es constitutiva y esencial para la bacteria (Ortega *et al.*, 2007). La síntesis de este componente junto con la contribución de otros genes como *ispH* (implicado en la síntesis de isoprenoides), *rpoE*, *norM* (codifican bombas de eflujo), y *hpnJ* (codifican hopanoides), juegan un papel muy importante en la resistencia a las polimixinas (Loulet y Valvano, 2011; Malott *et al.*, 2012).

1.5.2.2. Mecanismos de resistencia a colistina adquiridos en la familia *Enterobacteriaceae*

Con el paso de los años se ha identificado la aparición de mecanismos de resistencia a polimixinas en diversos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, tales como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* o *Salmonella*. Dentro de los mecanismos de resistencia descritos el más común es la modificación del LPS mediante la unión

covalente de las mismas moléculas que se observan en algunas bacterias que son intrínsecamente resistentes. Los mecanismos que confieren resistencia a colistina pueden ser de naturaleza cromosómica, cuando surgen como resultado de mutaciones, o plasmídica, cuando se producen tras la expresión de nuevas funciones génicas captadas por las bacterias (Olaitan *et al.*, 2014; Poirel *et al.*, 2017).

1.5.2.2.1. Mecanismos de resistencia a colistina de naturaleza cromosómica

De manera similar a lo que ocurren en las bacterias naturalmente resistentes a colistina, en la familia *Enterobacteriaceae* la resistencia a colistina se debe a la adición de grupos catiónicos (L-Ara4N y pEtN) en el LPS. Varios genes están involucrados en la modificación del LPS, incluyendo los que codifican enzimas que están implicadas en la modificación del LPS, como *pmrC*, *pmrE* y el operón *pmrHFJKLM*; así como los genes reguladores de los sistemas de doble componente PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ y *CrrA/CrrB* y sus propios genes reguladores, tales como el gen *mgrB*, regulador negativo del sistema PhoP/PhoQ (Poirel *et al.*, 2017).

En numerosos estudios *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ha sido utilizada como modelo bacteriano de estudio de los mecanismos de resistencia frente a los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs), así como de las polimixinas. En la mayoría de las cepas de *Salmonella* resistentes a polimixinas se produce una modificación del LPS, la cual se debe a estímulos externos como la concentración de Mg^{2+} y, principalmente, a mutaciones localizadas en sistemas de doble componente (TCS) como los sistemas PmrA/PmrB y PhoP/PhoQ (Olaitan *et al.*, 2014).

Las mutaciones en estos TCS ocasionan la sobre expresión constitutiva y la activación de los operones *arnBCADTEF* (también denominado como *pmrF* o *arnT*) y *pmrCAB*, los cuales producen la modificación del LPS mediante la adición de L-Ara4N y PEtN en el lípido A, respectivamente. Este hecho ya fue descrito en 1981 por Vaara y colaboradores, quienes observaron, en una cepa de *Salmonella typhimurium* con una mutación en *pmrA*, una concentración de 4 a 6 veces mayor de L-Ara4N en el lípido A, así como un mayor nivel de PEtN que en la cepa parental.

Algunos estudios, con modelos *in vitro*, han caracterizado las mutaciones que activan el sistema PmrA/PmrB en cepas de *S. typhimurium* resistentes a polimixinas. Las mutaciones descritas en la bibliografía que confieren resistencia a colistina están localizadas en los genes *pmrA* (Roland *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 2009) y *pmrB* (Sun *et al.*, 2009) y producen una sobre expresión del gen *pmrH* (también denominado como *arnB*). Teniendo en cuenta los datos bibliográficos, son más comunes las mutaciones en el gen *pmrB* en comparación con las mutaciones en su gen regulador, *pmrA*. Un mutante de *Salmonella* sin *pmrA* es 10000 veces más sensible a la polimixina B que una cepa salvaje (Pérez y Groisman, 2007). Sin embargo, no todas las mutaciones en estos genes confieren resistencia a colistina (Agero *et al.*, 2012).

En cepas de *Salmonella* que no pueden decorar su LPS mediante la adición de L-Ara4N y/o PEtN, se puede producir la desacilación del lípido A, es decir, la eliminación del R-3-hidroximiristato de la posición 3 del lípido A, por la acción de PagL, el cual es activado por PhoP (Trent *et al.*, 2001) y que aumenta la resistencia a las polimixinas (Kawasaki *et al.*, 2007). Las distintas vías que modifican el lípido A mediante la adición de L-4AraN o PEtN o la desacilación pueden compensarse en algunas cepas.

Otros genes implicados en la resistencia a polimixinas, como el gen *rpoN*, son independientes de los sistemas PmrA/PmrB y PhoP/PhoQ. El factor sigma alternativo denominado como *rpoN* activa la transcripción de gran cantidad genes (Kazmierczak *et al.*, 2005) y juega un papel importante en la resistencia a polimixinas, posiblemente debido a que la inactivación de *rpoN* produce la desregulación de genes implicados en la resistencia a las polimixinas cuya expresión está controlada por dicho gen.

Por otro lado, en cepas resistentes a polimixinas de *Escherichia coli* la decoración del LPS se produce principalmente mediante la adición al lípido A de 2- aminoetanol y L-4AraN. La adición de la molécula de 2- aminoetanol al grupo difosfato se produce mediante un enlace glicosídico, mientras que L-4AraN se une al fosfato 4' del lípido A (Nummila *et al.*, 1995).

En *Escherichia coli*, además de la activación de Ugd y del operón *arnT* (*arnBCADTEF*), mediante la fosforilación previa de PmrA (Aguirre *et al.*, 2000), Etk,

una tirosin quinasa, produce la fosforilación de Ugd (también denominada como PmrE), participando así en la resistencia a polimixinas (Lacour *et al.*, 2006).

La fosforilación de la proteína Ugd, una UDP- glucosa deshidrogenasa, por Etk incrementa la actividad deshidrogenasa de Ugd, incrementando así la síntesis de ácido UDP- glucurónico, un precursor utilizado por el operón *arnT* para la síntesis de L-Ara4N (Lacour *et al.*, 2008), de tal manera que la modificación del LPS mediante la adición de L-Ara4N está parcialmente regulada por el gen *etk*.

Por otro lado, al igual que en *Salmonella*, el LPS puede ser modificado por la adición de PEtN. Dicha reacción está mediada por el gen *pmrC* y regulada a su vez por la proteína PmrA (Raetz *et al.*, 2007). Está descrito que en algunos serotipos de *E. coli* (como por ejemplo *E. coli* O157:H7) el LPS se modifica principalmente por la adición de PEtN debido a un incremento de actividad del gen *pmrC*, confiriéndole así resistencia a CAMPs (Kim *et al.*, 2006).

En cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) los genes implicados en la decoración del LPS, mediante la adición de L-Ara4N al lípido A, se sobre expresan con la presencia de sales biliares (Kus *et al.*, 2011), alterando así la permeabilidad de la célula e incrementando su resistencia a las polimixinas y a las defensinas producidas por las células de Paneth del intestino delgado (Ayabe *et al.*, 2014; Ouellette, 2005).

Otro determinante de resistencia que está implicado en la resistencia a las polimixinas en *Escherichia coli* (que también se ha observado en *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*) es *mgrR*, un ARN bacteriano pequeño que se une a la proteína Hfq y que, estando regulado por el sistema PhoP/PhoQ, controla negativamente la expresión del gen *eptB* (Raetz *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2005), disminuyendo así la adición de PEtN en el core del LPS y aumentando la carga negativa del mismo. La delección de *mgrR* en *E. coli* incrementa la resistencia a polimixina B (Moon y Gottesman, 2009).

Además, la expresión del TCS PhoP/PhoQ está regulado por un pequeño ARN de unión a la proteína Hfq denominado MicA, el cual inhibe la expresión de PhoP (Coornaert *et al.*, 2010).

En 2013, Guckes y colaboradores, identificaron la relación entre el sistema de doble componente PmrA/PmrB y las proteínas reguladoras del Quorum-Sensing

(QseB/QseC), de tal manera que PmrB activa a QseC y PmrA regula la activación del TCS QseB/QseC. Esta activación permite que se establezcan interacciones con otros TCS, como los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB, relacionados con la resistencia a CAMPS.

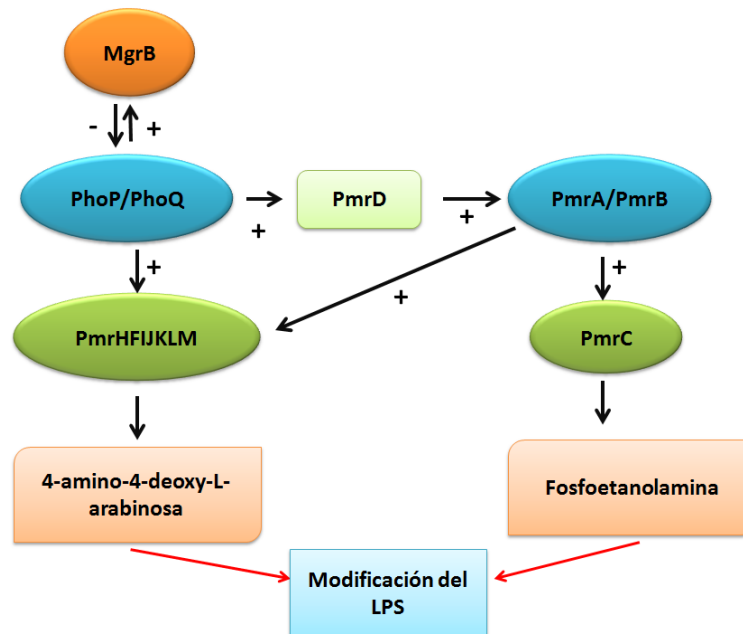


Figura 11: Mecanismos de resistencia a colistina de naturaleza cromosómica en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.

1.5.2.2.2. Mecanismos de resistencia a colistina de naturaleza plasmídica

Como ya hemos comentado anteriormente, el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas puede ser modificado por la activación de distintas vías cromosómicas, dentro de las que se encuentran los sistemas PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ y los genes *mgrB* y *mgrR*.

Hasta hace unos años las polimixinas eran el único antimicrobiano que no poseía un mecanismo de resistencia de transferencia horizontal. A finales de 2015, Liu y colaboradores descubrieron el primer gen de naturaleza plasmídica que confiere resistencia a colistina, *mcr-1*. Posteriormente, durante los años 2016, 2017 y 2018, se identificaron otros genes de naturaleza plasmídica que confieren resistencia a las polimixinas, los denominados *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* y *mcr-8*. Los genes plasmídicos que movilizan resistencia a colistina, denominados *mcr*, es decir, genes movilizables que confieren resistencia a colistina (del inglés “mobilizable

colistin resistance”), codifican enzimas fosfoetanolamina transferasas que modifican el lípido A del LPS.

En noviembre de 2015, Liu y colaboradores describieron la presencia del primer gen de naturaleza plasmídica y movilizable que confiere resistencia a polimixinas en cepas de *Escherichia coli* de origen humano y animal (porcino) en China y que denominaron como *mcr-1*.

El descubrimiento de este gen de naturaleza plasmídica fue sumamente importante ya que hasta el momento la resistencia a colistina estaba relacionada con genes cromosómicos y no había evidencias de transferencia horizontal de la misma. Describiendo así un hecho de gran relevancia en microbiología, al tratarse del primer gen de naturaleza plasmídica que confiere resistencia a las polimixinas, único grupo antimicrobiano que, hasta ese momento, no presentaba determinantes de resistencia transferibles horizontalmente.

El gen *mcr-1* codifica una fosfoetanolamina transferasa que produce la modificación del LPS de las bacterias Gram negativas, disminuyendo así la carga negativa del mismo e incrementando la resistencia a colistina de las bacterias que lo portan.

Aunque el origen de *mcr-1* no está bien definido, existen algunos estudios que indican que procede de especies del género *Moraxella*, ya que presenta una identidad nucleotídica del 96.6% con la secuencia del gen *eptA* de esta bacteria (AbunOun *et al.*, 2017). Sin embargo, el origen inmediato de *mcr-1* previo a su movilización aún no se conoce. No se detectan referencias previas a *mcr-1* en las bases de datos, aunque sí se ha encontrado la presencia del transposón IS*Apl-1*, frecuentemente asociado a *mcr-1*, en *Actinobacillus pleuroneumoniae* (Tegetmeyer *et al.*, 2008), un patógeno porcino, por lo que se cree que esta especie pudo haber sido un huésped ancestral de *mcr-1*.

Tras su descripción en China en 2016, han sido múltiples los trabajos que han descrito la presencia de *mcr-1* tanto en cepas de origen animal (animales de compañía, domésticos y salvajes) como humanas, diseminándose a lo largo del mundo (Figura 12). Las especies bacterianas en las que se ha descrito *mcr-1* son *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella sonnei*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*,

Kluyvera ascorbata, *Cronobacter sakazakii*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *K. oxytoca*, *Shigella flexneri*, *Escherichia albetii*.

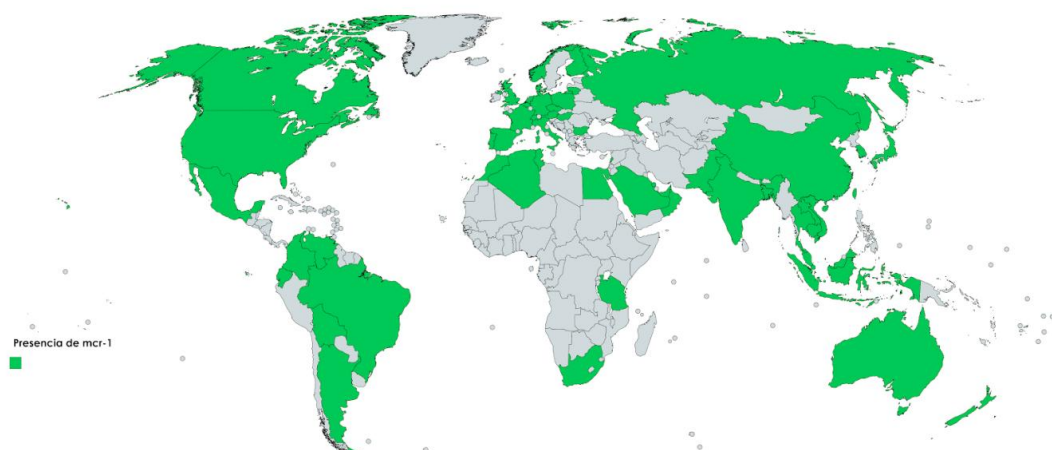


Figura 12: Distribución del gen *mcr-1* en el mundo. Información obtenida de la página www.ncbi.nlm.nih.gov a fecha de julio de 2018.

Según la base de datos consultada (www.ncbi.nlm.nih.gov), actualmente existen diez variantes del gen *mcr-1* detectadas en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, denominadas como *mcr-1.2* (KX236309), *mcr-1.3* (KU934208), *mcr-1.4* (KY041856), *mcr-1.5* (KY283125), *mcr-1.6* (KY352406), *mcr-1.7* (KY488488), *mcr-1.8* (KY683842), *mcr-1.9* (KY964067.1), *mcr-1.11* (KY853650.1) y *mcr-1.12* (LC337668.1). Estas variantes codifican enzimas fosfoetanolamina transferasas que difieren de la codificada por el gen *mcr-1* en un solo aminoácido. De tal forma que las modificaciones observadas son las siguientes: en MCR-1.2, en la posición 3 se sustituye una glutamina por una leucina; en la variante MCR-1.3, en la posición 37, se sustituye una isoleucina por una valina; en MCR-1.4, en la posición 439, se sustituye el ácido aspártico por asparagina; en la variante MCR-1.5, en la posición 451, se modifica una histidina por una tirosina; en MCR-1.6, en la posición 535, se cambia una arginina por una histidina; y en la variante MCR-1.7, en la posición 214, se modifica una alanina por una treonina. Además de estas variantes, en la base de datos encontramos otra variante del gen *mcr-1*, denominada como *mcr-1.10* (MF176238.1), un alelo hallado en una cepa de *Moraxella spp.*

En julio de 2016, Xavier y colaboradores describieron la existencia del segundo gen plasmídico movilizable que confiere resistencia a colistina, *mcr-2*, en Bélgica, en cepas de *Escherichia coli* procedentes de bovino y porcino. Este gen codifica una

fosfoetanolamina transferasa sulfatasa que interviene en la decoración del core y el lípido A del LPS mediante la adición de fosfoetanolamina. Según este estudio, *mcr-2* procede de especies del género *Moraxella*, siendo *Moraxella catarrhalis* su principal origen. Tras su descubrimiento en Bélgica, se ha descrito su presencia en cepas de origen humano en Suiza y China; y en cepas de origen animal (*Musca domestica* y *Protophormia terraenovae*) en China (Figura 13) (García-Graells *et al.*, 2017; Liassine *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018b). Desde su aparición en 2016 se han descrito tres variantes del gen *mcr-2* en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, denominadas *mcr-2.1*, *mcr-2.3* y *mcr-2.35*. Por otro lado, la variante de *mcr-2*, denominada como *mcr-2.2* (NG_055496.1) fue descrita en una cepa de *Moraxella pluranimalium*. Actualmente, teniendo en cuenta la bibliografía existente, la localización de los genes *mcr-2* descritos es plasmídica.



Figura 13: Representación gráfica de la presencia del gen *mcr-2* en el mundo.

En junio de 2017 Yin y colaboradores descubrieron el tercer gen movilizable que confiere resistencia a colistina (*mcr-3*). Este gen fue encontrado en un plásmido de tipo IncHI2 en una cepa de *Escherichia coli* de origen porcino, en coexistencia con otros 18 determinantes de resistencia a antimicrobianos. La secuencia del gen *mcr-3* presenta un 45% y un 47% de identidad con los genes *mcr-1* y *mcr-2*, respectivamente. Además presenta una identidad entre el 99.8 y el 100% con respecto a las fosfoetanolamina transferasas encontradas en otras especies de la familia *Enterobacteriaceae* y entre un 94.1 y un 94.8% de identidad aminoacídica con las fosfoetanolamina transferasas de especies de la familia *Aeromonas*. Estos

datos sugieren que el gen *mcr-3* presente en la familia *Enterobacteriaceae* procede de bacterias del género *Aeromonas*. Tras su descubrimiento en China la presencia de *mcr-3* ha sido descrita en Malasia, Tailandia, Vietnam, Estados Unidos, Brasil, Dinamarca, Francia, Alemania y España, tanto en cepas de origen humano como origen animal (Figura 14). Además de en *Escherichia coli*, la presencia de *mcr-3* se ha detectado en las especies bacterianas *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae* y distintas especies del género *Aeromonas* (Eichhorn *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2017; Kieffer *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017b; Li *et al.*, 2018; Litrup *et al.*, 2017; Lupo *et al.*, 2018; Roer *et al.*, 2017; Wise *et al.*, 2018; Yamaguchi *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018 a; Zhang *et al.*, 2018 b).

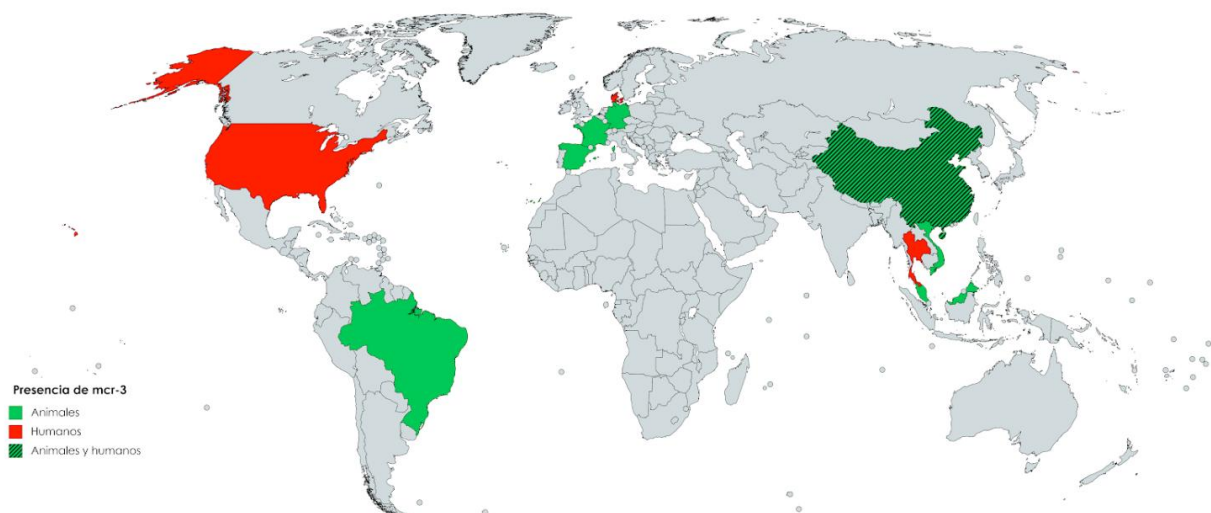


Figura 14: Distribución del gen *mcr-3* en el mundo.

A día de hoy existen diez variantes de *mcr-3*, denominadas como *mcr-3.2* (NPZH01000177.1), *mcr-3.3* (MF495680.1), *mcr-3.4* (FLXA01000011.1), *mcr-3.5* (MF463699.1), *mcr-3.6* (MF598076.1), *mcr-3.7* (MF598077.1), *mcr-3.8* (MF598079.1), *mcr-3.9* (MF598080.1), *mcr-3.10* (MG214533.1) y *mcr-3.11* (MG489958.1). De las cuales solo las variantes *mcr-3.2*, *mcr-3.4*, *mcr-3.5*, *mcr-3.9* y *mcr-3.10* se han encontrado en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. Las variantes *mcr-3.3*, *mcr-3.6*, *mcr-3.7*, *mcr-3.8* y *mcr-3.11* se han encontrado en cepas de *Aeromonas spp.*

Su localización es principalmente plasmídica, aunque se ha descrito la localización cromosómica de *mcr-3* en una cepa de *Aeromonas veronii* en una cepa aislada de carne de pollo en China (Li *et al.*, 2017a; Ling *et al.*, 2017).

En julio de 2017, Carattoli y colaboradores descubrieron el cuarto gen movilizable que confiere resistencia a colistina, denominado como *mcr-4*. La presencia de este gen fue descrita en una cepa de *Salmonella enterica* monofásica serovar Typhimurium (4,5,12:i:-) de origen animal (porcino) en Italia y una cepa de *Escherichia coli* de origen animal (porcino) de España y Bélgica. Estas cepas fueron aisladas en 2013, en el caso de la *Salmonella enterica* y en 2015 y 2016 en el caso de las *Escherichia coli*.

Según el estudio realizado (Carattoli *et al.*, 2017), el gen *mcr-4* presenta una identidad aminoacídica de entre el 82 y el 99% con una fosfoetanolamina transferasa de cepas de *Shewanella frigidimarina*. Además presenta una identidad aminoacídica del 34, 35 y 49% con MCR-1, MCR-2 y MCR-3, respectivamente. Por otro lado cabe destacar que la movilización del plásmido que contiene *mcr-4* no conjuga por sí solo, sino que necesita la presencia de un plásmido colaborador que promueva la conjugación del gen. Tras su descripción en Italia, España y Bélgica, el gen *mcr-4* ha sido detectado también en China (Figura 15), tanto en cepas de origen animal (porcino y avicultura) como en cepas de origen humano (Carretto *et al.*, Chen *et al.*, 2018; García *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018b). Actualmente, en la base de datos encontramos una variante del gen *mcr-4* encontrada en una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, denominada como *mcr-4.2*.

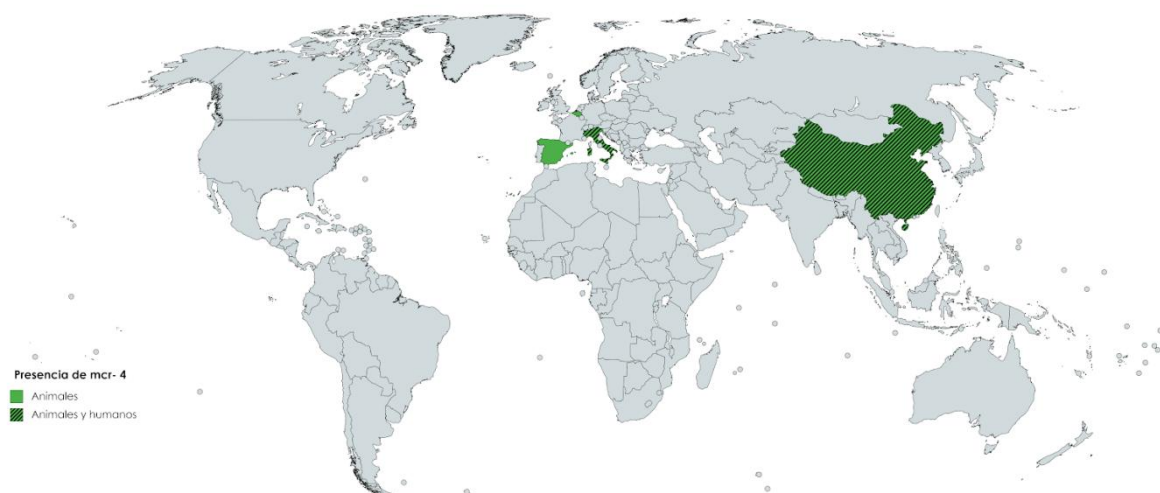


Figura 15: Distribución del gen *mcr-4* en el mundo.

En septiembre de 2017, Borowiak y colaboradores describen la presencia de un nuevo determinante plasmídico que confiere resistencia a colistina, denominado como *mcr-5*. Este determinante genético, que codifica una fosfoetanolamina transferasa, fue localizado en cepas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Paratyphi B fermentadora de D-tartrato procedentes del Laboratorio Nacional de Referencia de Salmonella de Alemania, de origen animal (carne de pollo y avicultura) y medio ambiente. La localización del gen *mcr-5* fue principalmente plasmídica, pero en el mismo estudio demuestran la localización cromosómica de este gen. Según Borowiak y colaboradores, *mcr-5* procede de una bacteria Gram negativa que puede ser aislada de fuentes ambientales y que rara vez produce infecciones humanas, *Cupriavidus gilardii*.

Tras ser descrito, se ha localizado la presencia de *mcr-5* en Colombia, China y España (Figura 16), tanto en cepas de origen animal (avicultura y porcicultura) y como humano (Chen *et al.*, 2018; García *et al.*, 2018b; Wise *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018b), siendo *Escherichia coli* la principal especie bacteriana en la que se localiza.

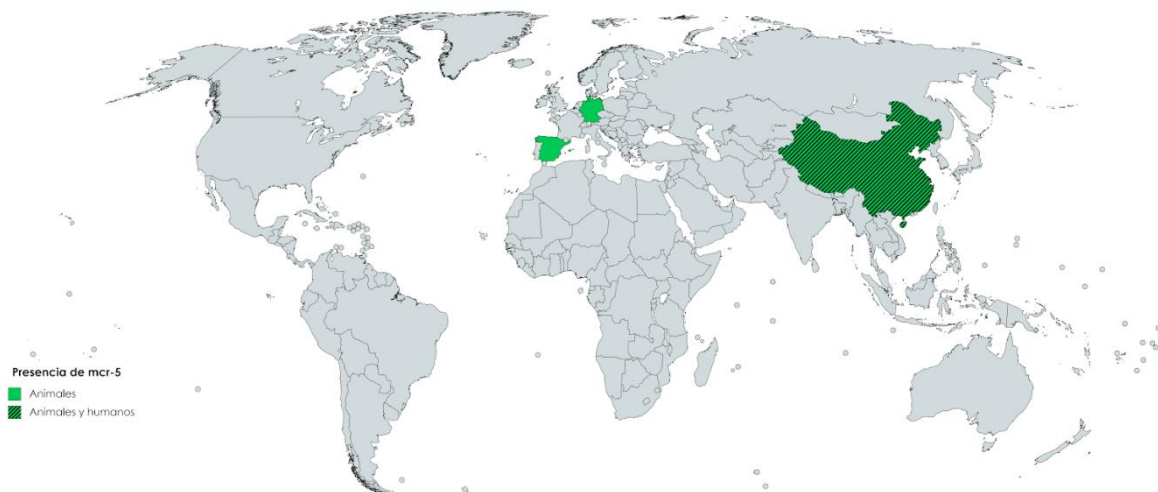


Figura 16: Distribución del gen *mcr-5* en el mundo.

Actualmente no se han descrito variantes de este gen que confiere resistencia a colistina. Además, la localización de todos los genes *mcr-5* identificados es plasmídica.

El sexto gen movilizable que confiere resistencia a colistina, *mcr-6*, fue descrito en 2017 por AbuOun y colaboradores como una variante del segundo gen movilizable que confiere resistencia a colistina, *mcr-2*. El gen *mcr-6* se ha detectado en una cepa de *Moraxella pluranimalium* (MF176240. 1) procedente de porcino de Gran Bretaña (Figura 17).



Figura 17: Distribución del gen *mcr-6* en el mundo.

En junio de 2018, Yang y colaboradores descubrieron la existencia de un nuevo determinante de resistencia a colistina movilizable, que denominaron como *mcr-7*. Este gen, que codifica una etanolamina transferasa, fue aislado en China (Figura 18) en cepas de *Klebsiella pneumoniae* (MG267386) de origen animal (avicultura). Este gen presenta un 78% de identidad nucleotídica con el gen *mcr-3*. Teniendo en cuenta los datos de este trabajo, el gen *mcr-7* parece proceder de especies del género *Aeromonas*.

En julio de 2018, Wang y colaboradores descubrieron la existencia de un nuevo determinante de resistencia a colistina movilizable, que denominaron como *mcr-8*. Este gen, que codifica una etanolamina transferasa, fue aislado en China (Figura 19) en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* (MG736312) de origen animal (porcino). Aunque los propios descriptores de *mcr-8* describen la presencia de este gen en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* aislada en China de un paciente humano depositada en la base de datos en 2016 (MPOD01000000).

Dicho gen fue localizado en un plásmido de tipo IncFII, el cual presenta genes involucrados en la estabilidad, la formación del pilus sexual y la transferencia conjugativa. Según los autores este gen presenta una identidad del 31.08%, 30.26%, 39.96%, 37.85%, 33.51% y 37.46% con respecto a MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4, MCR-5, MCR-6 y MCR-7, respectivamente.



Figura 18: Distribución del gen *mcr-7* en el mundo.

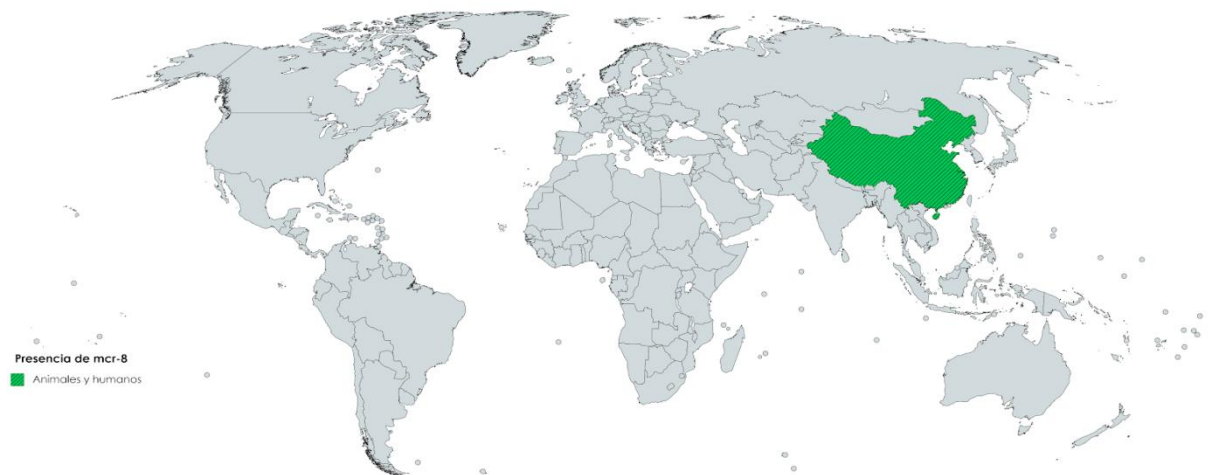


Figura 19: Representación gráfica de la presencia de *mcr-8* en el mundo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tras el descubrimiento en 1928 de la penicilina, los antibióticos han constituido una herramienta imprescindible para la salud pública, al salvar millones de vidas en todo el mundo. Sin embargo, la aparición y dispersión de bacterias resistentes ha revertido los avances sanitarios conseguidos hasta el momento. Convirtiéndose en uno de los mayores retos para la Medicina Humana y Veterinaria, sobre todo, debido a la dificultad de aplicar tratamientos efectivos, a nivel mundial.

Existen numerosos estudios que han demostrado la relación entre el abuso o uso inadecuado de antimicrobianos en animales y el incremento de resistencias en bacterias patógenas tanto humanas como animales (Neu, 1992; Mellon *et al.*, 2001). Sin embargo, la aparición de mecanismos de resistencia bacterianos no tiene únicamente su origen en la medicina veterinaria, sino que este problema se debe a la excesiva dispensación de antibióticos y su uso deficiente en pacientes humanos. Actualmente, en medicina humana las infecciones bacterianas son la segunda causa de muerte en el mundo. En el caso de los países desarrollados, a día de hoy, constituyen la tercera causa de muerte. Estudios recientes nos indican que en el año 2050, si no se toman medidas, la acción de las resistencias a los antimicrobianos constituirá la primera causa de muerte en el mundo, por delante del cáncer, ocasionando aproximadamente diez millones de muertes anuales.

En España, en mayo de 2018, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) presentó un estudio epidemiológico en el que establece que en nuestro país se producen más de 35000 muertes por infecciones ocasionadas por bacterias resistentes, 30 veces más que las muertes producidas por accidentes de carretera, que fueron 1200, según los datos de la Dirección General de Tráfico (DGT).

Como consecuencia de esta problemática surgió la Iniciativa Una Salud (*One Health Initiative*), un movimiento basado en la agrupación y coordinación de varias profesiones sanitarias, entre las que destacan la medicina humana y veterinaria, así como las dedicadas a la preservación del medio ambiente, con el objetivo de hacer

frente a las enfermedades de carácter zoonótico, dentro de las que destacan aquellas producidas por bacterias resistentes.

En 2014 la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) propuso el *Plan Nacional de Resistencias a los Antibióticos* (PRAN), el cual fue aprobado por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de la Salud y por la Conferencia Intersectorial de Agricultura, como respuesta a la Comunicación de la Comisión Europea del 17 de noviembre de 2011, que solicitaba a los Estados miembros un plan de acción sobre las resistencias antimicrobianas, así como a las Conclusiones del Consejo de la UE del 29 de mayo de 2012, en las que se requirió un abordaje conjunto de este problema.

En este *Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de diseminación de resistencias a los antibióticos*, que presenta una vigencia de cinco años (2014-2018) y que está compuesto por seis líneas estratégicas, se pretende afrontar uno de los grandes problemas de la Salud Pública y la Sanidad Animal. Dentro de la línea estratégica de *Vigilancia del consumo de antibióticos y de las resistencias a los antimicrobianos* destaca una medida: controlar el uso de antibióticos críticos, identificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como los antibióticos indispensables para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes en personas, limitando su prescripción en el ámbito de la salud animal. Dentro de esta relación de antibióticos críticos se encuentra la colistina, o polimixina E, un antibiótico polipeptídico que había sido excluido como tratamiento de pacientes humanos debido a su nefrotoxicidad y neurotoxicidad, y que debido a la gran expansión de bacterias Gram negativas multirresistentes, y en especial resistentes a carbapenemas, ha hecho necesario su reintroducción en el ámbito hospitalario.

Sin embargo, en mayo de 2015, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) clasifica la colistina como un agente antimicrobiano veterinario de importancia elevada para el tratamiento de infecciones digestivas ocasionadas por bacterias Gram negativas en animales de producción, acentuando así esta problemática al favorecer que se continúe usando un antibiótico de última opción terapéutica humana en producción animal. Sobre todo teniendo en cuenta que la administración

oral de tratamientos antimicrobianos ejerce una presión selectiva en la microbiota gastrointestinal, de manera que tras la aplicación del tratamiento pueden aparecer y/o persistir bacterias resistentes que provocan patologías gastrointestinales (Bartoloni *et al.*, 2006).

Teniendo estos antecedentes en cuenta, esta tesis doctoral se basa en el estudio de los mecanismos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos, enfocándose en el análisis de cepas bacterianas procedentes de aislados animales resistentes a un antibiótico de último recurso en medicina humana, la colistina.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** que persigue alcanzar este proyecto de tesis doctoral es estudiar los mecanismos de resistencia frente a un antimicrobiano de última opción terapéutica en medicina humana, la polimixina E o colistina, en cepas de *Escherichia coli* y de *Salmonella enterica* procedentes de aislados clínicos animales. Para la consecución del objetivo principal los **objetivos específicos** de esta tesis fueron los siguientes:

- Analizar los perfiles de resistencia antimicrobiana de los aislados para comprobar si la resistencia a colistina confiere resistencia cruzada frente a la polimixina B.
- Selección *in vitro* de mutantes resistentes a colistina a partir de una cepa sensible de referencia cuyo genoma está completamente secuenciado: *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Analizar la existencia de polimorfismos en genes implicados en la resistencia a colistina, como el sistema *pmrAB*, tanto en los aislados clínicos como en los mutantes seleccionados *in vitro*.
- Analizar la existencia de genes de tipo *mcr* que confieren resistencia a colistina en los aislados de origen animal. Estudiando su localización, cromosómica y/o plasmídica, y en el último caso determinando el tamaño del plásmido que lo contiene y su potencial de dispersión.
- Analizar la estabilidad “*in vitro*” de los fenotipos de resistencia a colistina, tanto en los aislados clínicos como en los mutantes seleccionados *in vitro*.
- Puesta a punto de la extracción de ARN de cepas de *Escherichia coli* para medir la expresión del gen *pmrH* mediante qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real), en los mutantes resistentes a colistina seleccionados *in vitro*.
- Analizar el genoma de al menos un mutante resistente a colistina seleccionado *in vitro*, que carezca de mutaciones en el sistema *pmrAB*, para identificar posibles (nuevos) determinantes de resistencia. Estos mismos determinantes servirían para investigar, posteriormente, los aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* que carezcan de mutaciones en el sistema *pmrA/pmrB*, así como de genes de tipo *mcr*.
- Demostrar el papel de las nuevas mutaciones detectadas mediante transferencia y sustitución alélica en un fondo genético salvaje.

ESQUEMA DE TRABAJO

3. ESQUEMA DE TRABAJO

Una vez presentados los objetivos del presente trabajo de tesis se detalla el esquema de trabajo seguido en esta investigación (Figura 20).

- Constitución del cepario con enterobacterias zoonóticas, de los géneros *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, aisladas en el servicio de VISAVET y con mutantes espontáneos independientes resistentes a colistina a partir de una cepa de colección (*Escherichia coli* ATCC 25922) aislados en los laboratorios del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética y en la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres.
- Aislamiento de las cepas para la obtención de un cultivo puro y almacenamiento de las cepas a -80°C.
- Extracción de ADN cromosómico de las cepas aisladas y conservación a -20°C.
- Estudio del crecimiento bacteriano en presencia y ausencia de colistina cepas aisladas de animales y en los mutantes seleccionados *in vitro*.
- Determinación del tiempo de generación de los mutantes resistentes a colistina seleccionados *in vitro*.
- Estudio de la sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas frente a colistina y polimixina B.
- Estudio de la estabilidad del fenotipo de las cepas de esta investigación, cultivando las mismas en un medio sin colistina durante ocho ciclos de crecimiento.
- Análisis de las cepas aisladas mediante técnicas de PCR con el objetivo de detectar polimorfismos en genes cromosómicos y/o la presencia de genes de tipo *mcr*, que pueden ser de naturaleza cromosómica o plasmídica y que confieren resistencia a colistina.
- Caracterización de la localización de los genes *mcr-1* y *mcr-3* identificados en este trabajo mediante la realización de electroforesis en campo pulsante, transferencia a membrana e hibridación.
- Determinación de la movilidad de los plásmidos que contienen genes de resistencia a colistina y/o genes de resistencia a betalactámicos mediante la realización de ensayos de conjugación y transformación.

- Extracción del ARN y determinación de la expresión génica de *pmrH* en los mutantes resistentes a colistina seleccionados *in vitro*.
- Transplante de las nuevas mutaciones encontradas en el sistema *pmrAB* en *Escherichia coli*, así como de los nuevos alelos encontrados y valoración de la expresión de la resistencia a colistina.

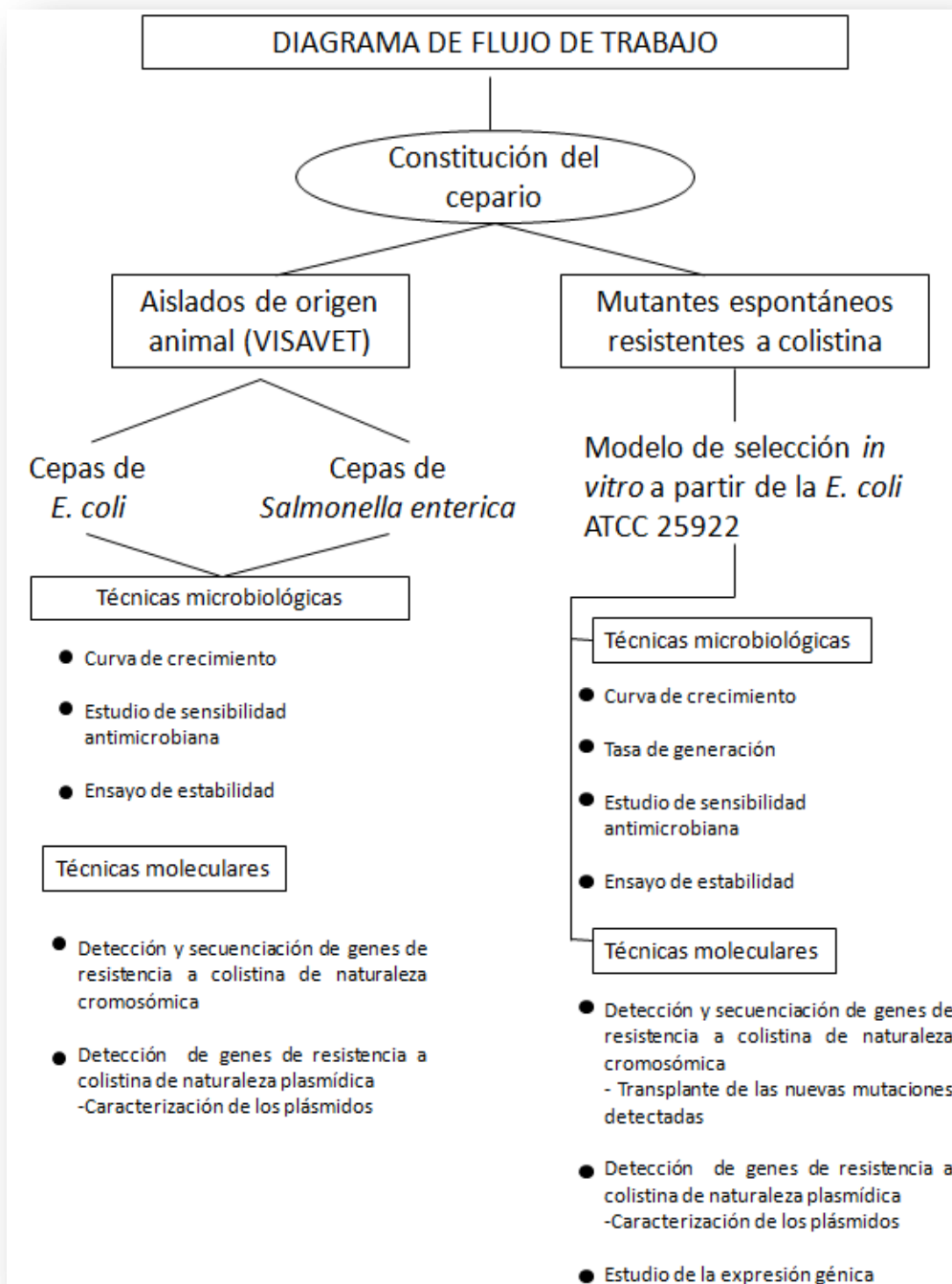


Figura 20: Esquema de trabajo llevado a cabo para el estudio de las cepas bacterianas incluidas en este estudio de investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para este estudio se dispuso de 118 cepas, de las cuales 108 fueron aisladas por el Servicio de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid; el resto, 10 cepas, fueron aisladas en los laboratorios del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética y en la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, a partir de una cepa de colección de *Escherichia coli* (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Para agilizar el trabajo en el laboratorio a las cepas procedentes de VISAVET se les asignó otra nomenclatura, que consistió en la abreviatura Sal, en el caso de las cepas de *Salmonella enterica*, y Eco, en el caso de las cepas de *Escherichia coli*, seguida de un número, en función de su llegada y análisis al laboratorio. Por otro lado los mutantes espontáneos resistentes a colistina se nombraron con las letras CR, de “Colistin Resistant”, seguida de un número, en función de su aislamiento.

5.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *Escherichia coli* que componen el cepario de esta investigación se detallan a continuación:

5. 1. 1. 1. **Mutantes espontáneos independientes resistentes a colistina procedentes de la cepa de colección *Escherichia coli* ATCC 25922.**

Con el objetivo de crear un modelo *in vitro* para estudiar las mutaciones cromosómicas que confieren resistencia a colistina en *Escherichia coli* se realizó una selección *in vitro* de diez mutantes espontáneos e independientes resistentes a colistina a partir de una cepa de colección (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Para realizar la selección *in vitro* de los mutantes espontáneos se cultivan 20 μ L del glicerol de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 en medio LB sólido y se incuba a 37°C durante toda la noche (unas 18- 20 horas). Seguidamente se seleccionan 10 UFC independientes y se disgrega cada una de ellas, por separado, en medio LB líquido y se incuban a 37°C y agitación (200 rpm), durante 18-20 horas aproximadamente. A continuación, se inoculan 100 μ L del cultivo en medio LB agar suplementado con 4 mg/L de colistina y se incuban a 37°C durante una noche (unas 18-20 horas, aproximadamente). Transcurrido ese tiempo se toma una colonia de cada placa y se disgrega en LB líquido suplementado con 4 mg/L de colistina y se incuban a 37°C y agitación (200 rpm) durante 18-20 horas. Seguidamente, tal y como se observa en la figura 21, se realiza la conservación en glicerol al 20% de las cepas resistentes a colistina.

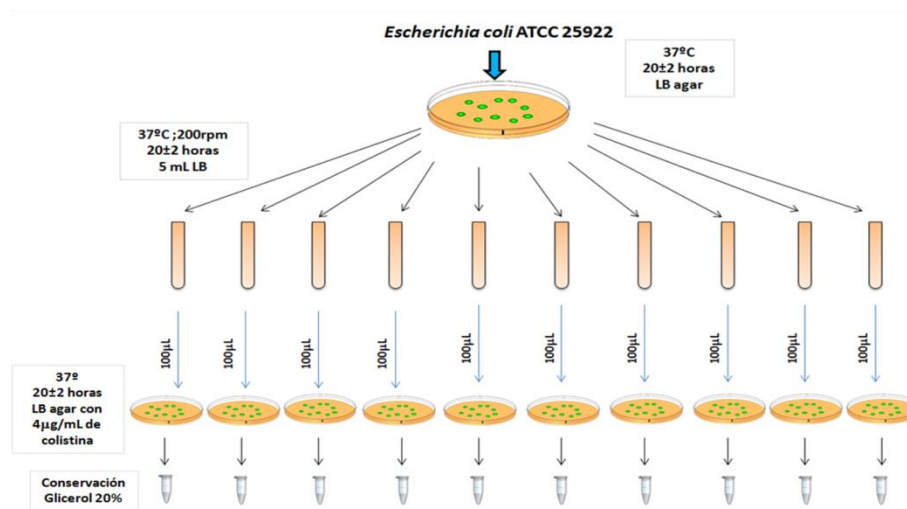


Figura 21: Representación gráfica del modelo de selección *in vitro* de mutantes espontáneos independientes resistentes a colistina de la cepa de colección ATCC 25922.

5. 1. 1. 2. Cepas de *Escherichia coli* de origen animal

Las 80 cepas de *Escherichia coli* de origen animal se aislaron en VISAVET en el período de tiempo comprendido entre 2011 y 2016. El método de aislamiento utilizado consistió en utilizar medio sólido MacConkey (n=14), medio sólido MacConkey suplementado con 8 mg/L de colistina (n=10) y medio sólido específico para aislar cepas productoras de betalactamasas (n=56).

Las cepas que componen este cepario procedían de heces de pavo (n=37), heces de porcino (n=37) y heces de bovino (n = 6).

5.1.2. Cepas de *Salmonella enterica* de origen animal

Las 28 cepas de *Salmonella enterica* de origen animal se aislaron en VISAVET en el período de tiempo comprendido entre 2009 y 2016, siguiendo el método oficial para aislamiento de *Salmonellas*.

Las cepas de *Salmonella enterica* presentes en este trabajo de investigación procedían de heces de porcino (n=1), ganglios de porcino (n=4), cáscara de huevo (n=17), heces de bovino (n=1), carne de porcino (n=1), carne de ave (n=1) y de distintos Laboratorios Regionales de Salud Pública (LRSP) (n=3).

5.1.3. Cepas de colección de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* utilizadas en esta investigación

5.1.3.1. *Escherichia coli* ATCC 25922

Se trata de una cepa de colección utilizada por el CLSI como control en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, tanto en microdilución como difusión en disco de los siguientes antibióticos: neomicina, colistina, polimixina B, kanamicina, cefalexina, gentamicina, cefamandol, cefalotina, tetraciclina, cefaloglicina, cefaloridina, cefalomicina, ácido nalidíxico y cloranfenicol. Además se utiliza como control negativo para la producción de toxinas de tipo LT y como control de calidad en los productos de Abbott, API, Autobac, BBL, bioMerieux, Vitek, Biosynth, Difco, IDS, Micro-Media, MicroScan™, Roche Diagnostics y Sensititre.

5. 1. 3. 2. *Escherichia coli* XL-1 Blue

La cepa *Escherichia coli* XL-1 Blue presenta el siguiente genotipo recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]. Esta cepa presenta resistencia a tetraciclina. Se trata de una cepa deficiente en endonucleasas, esto hace que la calidad de las preparaciones de ADN sea mayor. Además, al presentar una baja recombinación, la estabilidad de los plásmidos y sus insertos es mayor. Por otro lado la presencia del gen lacI q ZΔM15 permite

diferenciar las colonias recombinantes. Dadas sus características es una cepa muy utilizada como receptora de plásmidos recombinantes.

5. 1. 3. 3. *Escherichia coli* J53

La cepa *Escherichia coli* J53 (F(-) met pro Azi®) deriva de la cepa *Escherichia coli* K-12 y es resistente a la azida sódica. Esta cepa es ampliamente utilizada como cepa receptora en los experimentos de conjugación (Yi H y colaboradores, 2012).

5. 1. 3. 4. *Escherichia coli* SM-10

La cepa *Escherichia coli* SM-10 (λ pir) deriva de la cepa *Escherichia coli* K-12 y es resistente a kanamicina. Esta cepa presenta el siguiente genotipo *thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km λ pir*. Dada sus características esta cepa es utilizada como cepa movilizadora de genes integrados en plásmidos tipo IncP a su cromosoma. La presencia de λ pir permite la replicación de plásmidos suicidas y sus derivados.

5. 1. 3. 5. *Salmonella enterica* serovar Braenderup

Esta cepa de *Salmonella enterica* es utilizada como patrón de tamaño de ADN de elevado peso molecular tras la digestión de su genoma con la enzima *XbaI* y su posterior separación mediante electroforesis en campo pulsado.

5.2. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

5.2.1. Conservación de las cepas bacterianas

Al recibir las cepas de los laboratorios colaboradores (VISAVET) se realizó un pase en agotamiento de una única colonia en una placa de medio selectivo (LB con 2 mg/L de colistina) para conseguir un cultivo puro. Una vez obtenido el cultivo puro se procede a conservar las cepas para posteriores análisis.

Actualmente existen innumerables métodos que permiten la conservación de cepas bacterianas. En nuestro laboratorio las cepas se han conservado en crioviales o con glicerol.

5. 2. 1. 1. Conservación de cepas bacterianas en crioviales

Tras incubar a 37°C durante 18-24 horas en aerobiosis se toma una colonia y se realiza una siembra por agotamiento en medio LB agar suplementado con 2 mg/L de colistina. Posteriormente se incubará a 37°C durante 18-24 horas en aerobiosis.

Con un asa de siembra estéril se toma la mayor parte de las colonias crecidas en LB agar suplementado con 2 mg/L de colistina. Seguidamente, se sumerge el asa de siembra con las colonias entre la bolas microperforadas suspendidas en el medio de cultivo del criovial (Vikakstore ®) hasta que se desprende el inóculo. A continuación, se deja reposar 2-3 minutos y se extrae el medio de cultivo con una micropipeta para posteriormente congelar el criovial a -80°C.

5. 2. 1. 2. Conservación de cepas bacterianas en glicerol

Tras la obtención de un cultivo puro se toma una colonia y se inocula en medio LB líquido suplementado con 2 mg/L de Colistina y se incuba a 37°C durante 18-24 horas en aerobiosis y agitación (150 rpm).

Dado que las células resisten la ultracongelación suspendidas en una dilución de glicerol al 20%. Se pipetea 300 µL del cultivo bacteriano en LB líquido con 2 mg/L de Colistina, comentado anteriormente, en un tubo de 1,5 mL y se añaden 200 µL de glicerol estéril diluido al 50% en agua destilada. Posteriormente se congela a -80°C.

Todas las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis doctoral fueron conservadas por duplicado en congelación a -80°C, manteniendo una colección en la Unidad de Genética y otra en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

5.2.2. Estudio de sensibilidad antimicrobiana

5. 2. 2. 1. Determinación de la CMI mediante el método de microdilución en caldo

Para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana se utilizó el método de referencia de microdilución en caldo establecido en la norma ISO 20776-1, siguiendo las recomendaciones propuestas por la EUCAST, en las que se establece el uso de MH ajustado de cationes, sin aditivos y sulfato de colistina o de polimixina B, realizando el ensayo en placas de poliestireno no tratadas anteriormente.

5. 2. 2. 2. Determinación de la heterorresistencia

Para la determinación de la heterorresistencia en las cepas de *Salmonella enterica* de origen animal y en los mutantes espontáneos resistentes a colistina de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 se utilizaron dos métodos: las tiras *E-test* de colistina (MIC Test Strip Colistin, Liofilchem ® s.r.l., Italia) y el estudio del perfil del análisis de la población (PAP).

5. 2. 2. 2. 1. E- test

Para la determinación de la CMI en bacterias Gram negativas aerobias se siguieron las instrucciones del fabricante, cultivando 100 µL de inóculo bacteriano a 0,5 McFarland en medio Mueller Hinton II a 37°C durante 16-20 horas.

5. 2. 2. 2. 2. Estudio del perfil del análisis de la población (PAP)

Recibe este nombre del inglés Population Analysis Profiling. Esta técnica, descrita por Alfaway y colaboradores en 2015, es considerada como *gold standard* para la determinación de la heterorresistencia.

Con este método se somete la población bacteriana a una concentración de antibiótico ascendente (ya sea en medio líquido o en medio sólido) y el crecimiento bacteriano es cuantificado.

Tras cultivar durante una noche a 37°C en un medio MH II sin antibiótico se realizan diluciones seriadas 1:10 hasta llegar a 10^{-8} , para posteriormente inocular cada una

de ellas por triplicado en placas de MH II suplementadas con distintas concentraciones de colistina, comprendidas entre 0,125 y 32 mg/L. Tras incubar durante una noche a 37°C se realiza el recuento de UFC y se representa gráficamente para determinar si cumplen con los criterios de heterorresistencia propuestos por Halfaway y Valvano en 2015, que establecen una diferencia igual o superior a 8 veces la concentración de antibiótico entre la concentración no inhibitoria más alta y la concentración inhibidora más baja.

5.2.3. Curvas de crecimiento bacteriano

En 1949 el premio Nobel de Medicina Jaques Monod describió la curva de crecimiento (Monod *et al.*, 1949), una herramienta muy importante en Microbiología, que consiste en una representación gráfica del crecimiento de una población bacteriana a lo largo del tiempo, y nos permite comprender el crecimiento de estos microorganismos, hecho de suma importancia en el ámbito microbiológico ya que resulta crucial para trabajar en el laboratorio.

En la representación gráfica del crecimiento bacteriano de una población en un recipiente en el que no hay renovación de medio podemos diferenciar las fases de adaptación o latencia, exponencial, estacionaria y de muerte celular.

Con el objetivo de observar el crecimiento bacteriano de las cepas de nuestra colección se realizó una medición de la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm a lo largo del tiempo, hasta completar un periodo de 24 horas de un cultivo líquido en medio LB suplementado con colistina a 2 mg/L y sin suplementar crecido a 37°C y agitación.

Por un lado, a los mutantes espontáneos independientes resistentes a colistina procedentes de *Escherichia coli* ATCC 25922 se les analizó el crecimiento midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro convencional, así como la determinación del tiempo de generación mediante recuento de UFC.

Posteriormente, al disponer de una tecnología más avanzada (MULTISKAN-GO), y dado que no existen investigaciones previas que analicen el crecimiento bacteriano de cepas resistentes a colistina, analizamos el resto de cepas (cepas de *Escherichia*

coli y *Salmonella enterica* de origen animal). En estos casos el tiempo de generación fue determinado estableciendo una relación estimativa entre el número de colonias y la absorbancia.

5. 2. 3. 1. Mutantes espontáneos independientes resistentes a colistina procedentes de *Escherichia coli* ATCC 25922

Al realizar la curva de crecimiento de los mutantes resistentes a colistina se realiza paralelamente el cálculo de la tasa de generación de dichas cepas.

5. 2. 3. 1. 1. Curva de crecimiento

Partiendo de un cultivo crecido durante toda la noche (unas 18-20 horas aproximadamente) se realiza una dilución 1:100 del inóculo y se cultiva en matraces de 250 mL, con LB líquido y LB líquido suplementado con 2 mg/L de colistina, a 37°C y 200 rpm durante 24 horas. A continuación, se realizan mediciones de absorbancia a 600 nm de longitud de onda cada hora hasta las 4 horas de crecimiento, posteriormente cada dos horas hasta las 8 horas de crecimiento, y una última medición a las 24 horas de crecimiento.

Finalmente, con ayuda del programa informático *Excel* se realiza el tratamiento de los datos obtenidos para el diseño de las gráficas.

5. 2. 3. 1. 2. Tasa de generación

Para determinar la tasa de generación de los mutantes espontáneos independientes resistentes a colistina y de su cepa de procedencia (*E. coli* ATCC 25922) se realiza una dilución 1:100 del inóculo, que previamente ha sido crecido durante toda la noche, y se cultiva en matraces de 250 mL, con LB líquido y LB líquido suplementado con 2 mg/L de colistina, a 37°C y 200 rpm.

A continuación, se realizan cultivos en el tiempo 0 y a 1, 2, 3, 4 y 5 horas de crecimiento de 100µL de una dilución (comprendida entre 10^{-3} y 10^{-8}) del cultivo en crecimiento en placas de LB agar y LB agar suplementadas con colistina a 2 mg/L que se incuban a 37°C durante toda la noche (unas 18- 20 horas aproximadamente).

Una vez transcurrido ese tiempo, se realiza el recuento de UFC y se utiliza la siguiente fórmula para la determinación de la tasa de crecimiento:

$$\ln N - \ln N_0 = \mu (t - t_0)$$

$$\tau = \ln 2 / \mu$$

(Monod *et al.*, 1949)

Donde N es el número de UFC; t es el tiempo; μ es la velocidad máxima del crecimiento bacteriano; τ es la tasa de generación.

5. 2. 3. 2. Cepas bacterianas resistentes a colistina de origen animal

Partiendo del protocolo descrito en el artículo de Fonseca y colaboradores en 2014, se realiza una estandarización a 0,1, aproximadamente, de absorbancia a 600 nm de longitud de onda a partir de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche (unas 18-20 horas aproximadamente). A continuación se realizan cinco réplicas de cada cepa en medio LB líquido suplementado con 2 mg/L y cinco réplicas de cada cepa en medio LB líquido sin suplementar; además se añaden los correspondientes blancos, en los que se añaden LB líquido suplementado o sin suplementar con colistina a una concentración de 2 mg/L. Las réplicas de cada cepa bacteriana son cargadas en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano, depositando 250 μ L en cada uno de ellos. Seguidamente se introduce la placa de microtitulación en el MULTISKAN-GO y se incuba durante 24 horas a 37°C, con agitación suave de 20 segundos cada 30 minutos. Las mediciones de absorbancia, a una longitud de onda de 600 nm, se realizan cada 30 minutos, utilizando siempre la opción de corrección del paso óptico. Finalmente, con ayuda del programa informático *Excel* se realiza el tratamiento de los datos obtenidos para el diseño de las gráficas.

5.2.4. Estudio de la estabilidad del fenotipo de resistencia a colistina

Para determinar la estabilidad fenotípica de nuestro cepario se realizó un estudio similar al realizado por Adams y colaboradores en 2009, para determinar el

porcentaje de supervivencia. De manera que se realiza un cultivo en medio líquido selectivo (LB suplementado con 2 mg/L de colistina) a 37°C y agitación (150 rpm) y se incuban durante toda la noche (unas 18-20 horas aproximadamente). Seguidamente se realiza una dilución 1:100 en LB líquido sin antibiótico y se cultiva a 37°C y 150 rpm durante 12 horas. Transcurridas las 12 horas se realiza un cultivo en placa de 100 µL de cultivo en medio LB agar y LB agar suplementado con 2 mg/L, este procedimiento se realiza por triplicado, y se incuban a 37°C durante 18-20 horas. A continuación se realiza el recuento de UFC en ambos medios y se calcula el porcentaje de resistentes a colistina, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células resistentes a colistina} = \text{UFC resistentes a colistina} / \text{UFC totales} \times 100$$

Por otro lado se realiza una dilución 1:100 en medio LB líquido que se cultiva a 37°C y 150 rpm durante 12 horas. Transcurridas las 12 horas se vuelve a cultivar en medio sólido, tal y como se ha descrito previamente.

Este procedimiento es repetido durante 8 ciclos de crecimiento, cada uno de ellos de una duración de 12 horas, cultivando en medio sólido en el primer ciclo de crecimiento y en los ciclos 2, 4, 6 y 8, tal y como se puede observar en la figura 22.

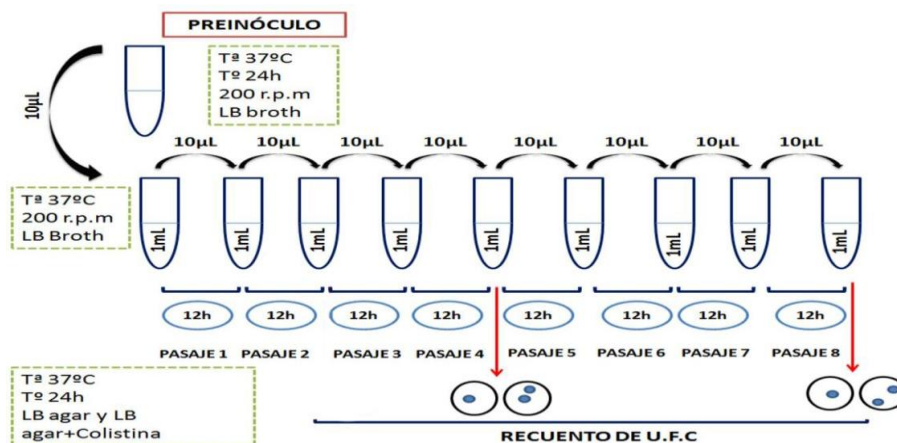


Figura 22: Representación gráfica del experimento para determinar la estabilidad del fenotipo bacteriano.

Con el objetivo de facilitar el análisis de los resultados establecimos tres categorías de estabilidad: **categoría A** o muy estables (que comprende aquellas cepas con una estabilidad igual o superior al 50%, tras 8 ciclos de crecimiento sin colistina); **categoría B** o baja estabilidad (que comprende las cepas que presentan una estabilidad inferior al 50% y superior al 10%, tras 8 ciclos de crecimiento sin colistina); y **categoría C** o inestables (que comprende las cepas que presentan una estabilidad igual o inferior al 10%, tras 8 ciclos de crecimiento sin colistina).

5.3. TÉCNICAS MOLECULARES

5.3.1. Extracción de ácidos nucleicos

5.3.1.1. Extracción del ADN cromosómico

Existen muchos métodos para la obtención de ADN cromosómico. En esta tesis doctoral hemos utilizado tanto kits comerciales como la técnica del hervido, dependiendo del procedimiento a realizar. La técnica utilizada en la mayoría de los casos, comúnmente denominada como “hervido”, proporciona un ADN cromosómico de pureza mínima pero suficiente para realizar la PCR.

En una placa de medio selectivo (Luria Bertani con 2 mg/L de colistina) se inoculan 20 µL del glicerol guardado a -80°C y se cultivan a 37°C durante 18-24h. A continuación, y tras comprobar que se trata de un cultivo puro se introducen las colonias en un tubo libre de ADN y ADNasas, al que previamente se le han añadido 500 µL de TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH8) ó agua mQ estéril y se agita en un vórtex. Después se centrifuga durante 2 minutos a 11000 g y se elimina el sobrenadante. Una vez eliminado el sobrenadante se añade 1mL de TE (ó agua mQ estéril) y se agita en un vórtex. Seguidamente se calienta el tubo a 100°C durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se centrifuga durante 2 minutos a 11000 g. Finalmente, el sobrenadante es almacenado a -20°C.

En aquellos casos en los que se requirieron preparaciones de ADN de mayor calidad, se utilizó el sistema comercial de extracción de ADN genómico *QIAamp DNA Mini Kit* (Quiagen). Siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante se obtuvo de una forma rápida y eficiente un ADN de calidad y en cantidad suficiente

para trabajos posteriores, que se cuantificó mediante una electroforesis de 0,9% de agarosa, utilizando el fago λ como marcador de peso molecular.

5. 3. 1. 2. Extracción del ARN

En una placa de medio selectivo (Luria Bertani con 2 mg/L de colistina) se inoculan 20 μ L de la cepa conservada con glicerol a -80°C y se cultiva a 37°C durante 18-24h. Seguidamente, se deposita una colonia aislada en un tubo que contiene LB con 2 mg/L de colistina y se cultiva a 37°C y agitación (150 rpm) durante 18-24h. Posteriormente, se realiza una dilución 1:100 del inóculo en un matraz de 250 mL y se cultiva a 37°C y agitación (200 rpm) hasta conseguir una absorbancia comprendida entre 0. 4 y 0. 5 a una longitud de onda de 600 nm.

Una vez conseguido este crecimiento transferimos el equivalente a 3 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600nm en un tubo de 2 mL estéril y centrifugamos a 12000g durante un minuto. Para determinar los mililitros de cultivo necesarios para conseguir 3 unidades de absorbancia utilizamos la siguiente fórmula:

$$3 = A^{600nm}/mL \times \text{Volumen del cultivo (mL)}$$

A continuación, descartamos el sobrenadante y le añadimos a la pella de células 100 μ L de una disolución fresca de Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) que contiene 500 mg/L de lisozima, pipeteando hasta disgregar por completo el sedimento celular.

Los siguientes pasos fueron realizados siguiendo las indicaciones del fabricante del kit utilizado (*AurumTM Total RNA mini kit*, BIO RAD).

Para la eliminación del ADN contaminante se utilizó el kit *TURBO DNA-free kit* de Applied Biosystems, siguiendo las indicaciones del fabricante.

5. 3. 2. Conservación de los ácidos nucleicos

Todas las alícuotas que contenían ADN cromosómico, plasmídico o genómico, así como los fragmentos de PCR, se conservaron en congelación a -20°C, perfectamente identificados con el nombre de la cepa y la fecha. Por otro lado, aquellas alícuotas que contenían ARN se conservaron en congelación a -80°C, perfectamente identificados con el nombre de la cepa y la fecha.

5. 3. 3. Electroforesis de agarosa para la cuantificación de ácidos nucleicos y fragmentos

La electroforesis de ADN y ARN se realizó utilizando geles de agarosa, con una concentración de agarosa comprendida entre 0,8 y 0,9% p/v, preparados en tampón TBE 1x (10x TBE Buffer de Lonza). Para visualizar por fluorescencia el ADN y el ARN al iluminarlo con luz UV se añadieron al gel de agarosa una dilución 1: 20000 de SYBER® Safe DNA gel stain (Invitrogen). Con el objetivo de cuantificar el ADN y/o el ARN obtenido, a cada 5 µL de muestra de ADN y/o ARN se añadieron 1,67 µL de tampón de carga fabricado por TaKaRa (6x Loading Buffer) y 3,33 µL de agua mQ estéril. La mezcla se depositó en un pocillo del gel, sumergido en una cubeta con tampón TBE 1x. La electroforesis se realizó en las cubetas horizontales (de las casas comerciales LABOLAN y ThermoFisher), con un voltaje constante de 70 V durante el tiempo necesario para separar los fragmentos de interés. Como marcadores de tamaño de los fragmentos se utilizaron los siguientes: DNA del bacteriófago λ digerido con *HindIII*, 100bp DNA (gTP- Ladder, gTPbio) y 1Kb DNA (gTP- Ladder, gTPbio)

5. 3. 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de genes de resistencia

Para la amplificación de secuencias de ADN se ha realizado una PCR en un volumen final de 20 µL, utilizando para ello el kit comercial *ThermoScientific DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)* de ThermoFisher. La concentración final de los cebadores utilizados varía en función del fragmento a analizar y se detalla a continuación junto con el programa de PCR utilizado y la cantidad de ADN incorporada para realizar el proceso. En esta investigación se ha realizado una PCR

múltiple para la detección de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M. Los oligonucleótidos utilizados se emplearon a una concentración final de 0,5 μ M (Tabla 3). Para la detección de los genes mcr se utilizaron los cebadores detallados en la tabla 4, a una concentración final de 0,25 μ M. Finalmente, para la amplificación de los genes cromosómicos los cebadores se utilizaron a una concentración final de 0,25 μ M, la secuencia de los mismos así como la programación utilizada se detalla en la tabla 5.

GENES/ REFERENCIA	CEBADORES Y PROGRAMACIÓN	AMPLICONES (pb)
SHV (Monstein <i>et al.</i> , 2007)	5'-ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3' 5'-TGC TTT GTT ATT CGG GCC AA-3' 95°C, 15 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 60°C 30 seg. ; 72°C, 2 min.); 72°C, 10 min.	747
TEM (Monstein <i>et al.</i> , 2007)	5'-ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT-3' 5'-TCG CCG CAT ACA CTA TTC TCA-3' 95°C, 15 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 60°C 30 seg. ; 72°C, 2 min.); 72°C, 10 min.	445
CTX-M (Monstein <i>et al.</i> , 2007)	5'-TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA-3' 5'-ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK-3' 95°C, 15 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 60°C 30 seg. ; 72°C, 2 min.); 72°C, 10 min.	593

Tabla 3: Tabla resumen de los genes amplificados, cebadores utilizados y condiciones de PCR y tamaño del amplicón esperado en pb.

GENES/ REFERENCIA	CEBADORES Y PROGRAMACIÓN	AMPLICONES (pb)
MCR-1 (Liu <i>et col.</i> , 2016)	5'-CGG TCA GTC CGT TTG TTC-3' 5'-CTT GGT CGG TCT GTA GGG-3' 94°C, 3 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 57°C, 30 seg. ; 72°C, 1 min.); 72°C, 5 min.	309
MCR-1 (En esta tesis)	5'-GCC ACG ATC AAG CCC AAT C-3' 5'-GAC GAT CGC TGT CGT GCT CT-3' 94°C, 3 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 68°C, 1 min.); 72°C, 5 min.	333
MCR-2 (En esta tesis)	5'-ACG CTC GCT CGG CTT GGT GGT C-3' 5'-CTC AAT GGC GGT GGC GGT GA-3' 94°C, 3 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 68°C, 1 min.); 72°C, 5 min.	512
MCR-3 (Yin <i>et al.</i> , 2017)	5'-TTG GCA CTG TAT TTT GCA TTT-3' 5'-TTA ACG AAA TTG GCT GGA ACA-3' 94°C, 3 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 55°C, 30 seg. ; 72°C, 1 min.); 72°C, 5 min.	542
MCR-4 (Carattoli <i>et al.</i> , 2017)	5'-ATT GGG ATA GTC GCC TTT TT-3' 5'-TTA CAG CCA GAA TCA TTA TCA-3' 94°C, 3 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 56. 3°C, 30 seg. ; 72°C, 1 min.); 72°C, 5 min.	487

Tabla 4: Tabla resumen de los genes plasmídicos amplificados, cebadores utilizados y condiciones de PCR y tamaño del amplicón esperado en pb.

GENES/ REFERENCIA	CEBADORES Y PROGRAMACIÓN	AMPLICONES (pb)
MRG B SALMONELLA (Este trabajo)	5'-GCG ACA TAA GAT GTA AGA TCG GAG A-3' 5'-GCA CCA GAG TTT AAA ACG TCG TTC-3' 94°C, 3 min. ; 35 x (94°C, 30 seg. ; 68°C, 2 min.); 72°C, 5 min.	270
MRG B E. COLI (Este trabajo)	5'-AAG ACG CAA TGT TCA TCA CGC CTG A-3' 5'-GCG ACT CAT TCC GAA AAA GCA CGA A-3' 94°C, 3 min. ; 35 x (94°C, 30 seg. ; 68°C, 2 min.); 72°C, 5 min.	361
PMR A E. COLI (Este trabajo)	5'-AGT TTT CCT CAT TCG CGA CCA-3' 5'-TAC CAG GCT GCG GAT GAT ATT CT-3' 94°C, 3 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 65°C, 30 seg. ; 72°C, 2 min.); 72°C, 5 min.	714
PMR B E. COLI (Este trabajo)	5'-GGA TGG CCT GAT GTG ACG CTG TC-3' 5'-GCG CGG CTT TGG CTA TAT GCT G-3' 94°C, 3 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 65°C, 30 seg. ; 72°C, 2 min.); 72°C, 5 min.	1312
PMRA SALMONELLA (Sun et al, 2009)	5'-CGC GAA TTT CGT GCA TGA TAT G-3' 5'-ATG TCC CGA TGC TCA TTT GGC-3' 94°C, 3 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 60°C, 30 seg. . ; 72°C, 2 min.); 72°C, 10 min.	1067
PMRB SALMONELLA (Sun et al, 2009)	5'-CGT TTT CAG CGA AGA GCG A-3' 5'-AGG AAA TTC TGG GCG AGCA-3' 94°C, 3 min. ; 30 x (94°C, 30 seg. ; 60°C, 30 seg. . ; 72°C, 2 min.); 72°C, 10 min.	1359

Tabla 5: Tabla resumen de los genes cromosómicos amplificados, cebadores utilizados y condiciones de PCR y tamaño del amplicón esperado expresado en pb.

5. 3. 4. 1. Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados

Para la recuperación y purificación de los fragmentos de ADN de los geles de agarosa se utilizó el sistema comercial *MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit Plus* (iNtRON BIOTECHNOLOGY), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuenciación de los fragmentos se llevó a cabo en el “Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia” (STAB) de la Universidad de Extremadura, utilizando el método de Sanger.

5. 3. 4. 2. Análisis bioinformático

Los cromatogramas recibidos por el servicio de secuenciación de la UEx (STAB) fueron analizados utilizando el programa *Chromas*, el cual nos permite obtener no

sólo la secuencia en formato FASTA, sino también observar la calidad del análisis de secuenciación.

Una vez obtenidas las secuencias en formato FASTA se procede al ensamblado de las mismas, utilizando para ello el programa <http://doua.prabi.fr/software/cap3>.

Tras ensamblarlas procedemos al estudio de los polimorfismos existentes comparando para ello nuestras secuencias problema con secuencias de cepas de referencia o con la propia base de datos del NCBI, utilizando las herramientas de *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5. 3. 5. Caracterización de los plásmidos con determinantes de resistencia a colistina

Para la caracterización de los plásmidos con determinantes de resistencia a colistina se realizaron ensayos de conjugación, así como la realización de campo pulsado de las cepas digeridas con nucleasa S1, transferencia a membrana e hibridación mediante Shouthern blot para determinar la localización de los genes *mcr-1* y *mcr-3*, así como el tamaño del plásmido que los porta. Por otro lado, la determinación del tipo de plásmido se realizó en el servicio de bioinformática del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

5. 3. 5. 1. Ensayos de conjugación

Aunque no se trata de una técnica molecular la incluimos en este apartado para que sea más fácil el seguimiento del método de trabajo utilizado en esta tesis.

Los experimentos de conjugación se han realizado utilizando como cepa receptora la bacteria *Escherichia coli* J53, una derivada de *Escherichia coli* K12 resistente a azida hasta 250 mg/L. Las células donadoras fueron positivas mediante PCR a alguno de los determinantes de resistencia a colistina de naturaleza plasmídica descritos. Además, también se realizó el ensayo de conjugación con cepas que no presentan ningún mecanismo de resistencia previamente descrito en la bibliografía, con el objetivo de identificar posibles nuevos determinantes de naturaleza

plasmídica. Por otro lado, se realizó la determinación del índice de conjugación en aquellas cepas resistentes a betalactámicos.

En primer lugar se cultivan las células, donadoras y receptoras, en medio de cultivo sólido selectivo, suplementado con 2 mg/L de colistina y azida 100 mg/L, respectivamente y se incuban a 37°C durante 18-24 horas. Seguidamente se recoge el crecimiento bacteriano con un asa de siembra (aproximadamente un asa de siembra por cultivo) y se disgrega en un mililitro de caldo LB. A continuación se centrifuga durante 3 minutos a 5000g, para posteriormente eliminar el sobrenadante. Después se añade un mililitro de caldo LB, se disgrega la pella de células y se centrifuga 3 minutos a 5000g. Tras retirar el sobrenadante se añade a la pella de células caldo LB. La cantidad de LB añadida varía en función del tipo de células: receptoras (50 µL de LB x [número de cepas a conjugar + 1]) o donadoras (150 µL).

A continuación se realiza el cultivo en medio LB agar sin antibiótico de manera que se cultiva en medio LB agar: 100 µL de células donadoras agar (donde 50 µL son de cultivo bacteriano y 50 µL de caldo LB); 100 µL de células receptoras (donde donde 50 µL son de cultivo bacteriano y 50 µL de caldo LB); y 100 µL de una mezcla de células donadoras y receptoras (donde 50 µL son de cultivo bacteriano de la célula receptora y 50 µL de cultivo bacteriano de la célula donadora).

En los tres casos se incuban las placas a 37°C durante una noche, durante unas 18-20 horas, aproximadamente. Seguidamente se recoge con un asa de siembra el material celular y se disgrega en 1 mL de caldo LB. A continuación se hacen diluciones y se cultivan, por triplicado, 100 µL.

Una vez cultivadas se incuban a 37°C durante una noche (18-20 horas, aproximadamente) y posteriormente se realiza el recuento de UFC para determinar el índice de conjugación. Para la determinación del índice de conjugación utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{IC} = \text{Número de UFC conjugantes} / \text{Número de UFC donadoras}$$

Donde el **número de UFC conjugantes** representa el número de UFC obtenidas al cultivar la mezcla de células donadoras y receptoras en medio doblemente selectivo; y el **número de UFC donadoras** representa el número de UFC obtenidas al cultivar la mezcla de células donadoras y receptoras en el medio selectivo de con un solo antibiótico.

5. 3. 5. 2. Transformación mediante electroporación

Para la transformación hemos utilizado la cepa de *Escherichia coli* XL1 Blue. Esta cepa es resistente a tetraciclina y además, presenta un genotipo (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*) que se caracteriza por tener una deficiencia en endonucleasas (*endA*), lo que facilita la conservación del ADN introducido en la bacteria, y un bajo nivel de recombinación (*recA*), mejorando la estabilidad del inserto introducido.

5. 3. 5. 2. 1. Preparación de células electrocompetentes

Se inoculan 20μL del glicerol de la cepa *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' en una placa de LB agar con 12 mg/L de tetraciclina y se cultivan a 37°C durante 18-24h. Transcurrido ese tiempo se toma una colonia y se deposita en medio LB líquido, que se cultiva a 37°C y agitación (200 rpm) durante 18-24h. Después se realiza una dilución 1:100 en LB y las células se incuban a 37°C y agitación fuerte (200 rpm) en el incubador orbital hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de longitud de onda comprendida entre 0,3 y 0,4.

Cuando las células alcanzan dicha densidad óptica se paraliza el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugan a 4°C y 1000g durante 20 minutos y se retira el sobrenadante. A continuación, se realiza un lavado con un volumen de agua fría estéril. Tras disgregar toda la pella de células se centrifugan durante 20 minutos a 4°C y 1000g y se retira el sobrenadante. Después se añaden 0,5 volúmenes de glicerol estéril al 10% frío y, tras disgregar la pella de células, se centrifugan de nuevo a 4°C y 1000g durante 20 minutos y se desecha el sobrenadante. Seguidamente se realiza el último lavado con 0,02 volúmenes de glicerol estéril al 10% frío y, tras disociar la pella de células, se

centrifugan a 4°C y 1000g durante 20 minutos, descartando el sobrenadante resultante. Finalmente las células se diluyen, añadiendo 0,002 volúmenes de medio GYT (compuesto por: glicerol al 10%, extracto de levadura al 0,125% y triptona al 0,25%), para que se encuentren a una concentración final comprendida entre 2 y $3 \cdot 10^{10}$ células/mL. En estas condiciones la conductancia de las células ha de ser menor de 5 mEq.

Para conocer la concentración final de las células se mide la absorbancia a 600 nm de una suspensión celular diluida 1000 veces, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia equivale, aproximadamente, a $2,5 \cdot 10^8$ células/mL. La suspensión resultante se guarda en alícuotas de 200 μ L, conteniendo cada una de ellas 100 μ L, para conservarlas posteriormente a -80°C.

5. 3. 5. 2. 2. Transformación de las células electrocompetentes

Las células de *E. coli* (XL1 *blue*) se modificaron genéticamente por transformación mediante electroporación en cubetas de electroporación de 0,2 cm (BioRad) frías, manteniéndose en hielo 5-10 minutos y empleando el equipo Micropulser (BioRad), utilizando el programa (EC2) con un voltaje de 2,5kV. La constante temporal tras el pulso ha de registrarse entre 4 y 5 ms con una intensidad de 12,5 kV/cm.

A 45 μ L de células electrocompetentes se le añaden entre 0,5 - 2 μ L de ADN plasmídico a introducir en la bacteria. Tras el pulso eléctrico se añaden 954 μ L de medio LB estéril a temperatura ambiente. Una vez mezclado con las células electrocompetentes, la mezcla se transfiere a un tubo de 2 mL estéril y se incuba durante una hora a 37°C en agitación.

Finalmente se inoculan 100 μ L de la suspensión celular y se reparten de forma homogénea en la superficie de una placa de Petri con LB agar suplementado con 2 mg/L de colistina. Posteriormente, se incuba a 37°C durante 18-24 horas.

Aquellas colonias que crecen en el medio LB agar suplementado con 2 mg/L de colistina son las células transformadas que han incorporado el plásmido. Seguidamente se toma una colonia y se cultiva en LB líquido con colistina a una

concentración de 2 mg/L, durante 18-24h a 37°C y agitación (150 rpm), para conservarlas con glicerol y extraer ADN con la técnica del hervido.

Una vez obtenido las células transformadas se procede a la amplificación de los genes tipo *mcr* mediante PCR, para confirmar si el plásmido es movilizable y si el gen tipo *mcr* está o no presente en el plásmido.

5. 3. 6. Electroforesis en campo pulsado

El PFGE es una técnica electroforética que permite separar moléculas de ADN de elevado peso molecular. En esta tesis doctoral utilizamos el equipo Cher-DR ® III System de BioRad, así como los reactivos de dicha marca.

El ensayo se divide en tres fases: la extracción y purificación del ADN, mediante la preparación de los bloques de agarosa; la digestión enzimática con la endonucleasa S1; y la electroforesis del producto digerido en condiciones de cambio de la dirección del campo eléctrico.

5. 3. 6. 1. Preparación de los bloques de agarosa

En primer lugar, se cultivan las cepas en medio selectivo (LB agar con colistina 2 mg/L) durante 20 horas. Es sumamente importante que las cepas a estudiar procedan de cultivos frescos en placa. Seguidamente se procede a disgregar parte del crecimiento bacteriano en 1 mL de tampón CSB (100 mM Tris y 100 mM EDTA pH 8). A continuación se realiza una dilución 1:10 de la solución celular con CSB utilizando como diluyente agua y se mide la absorbancia a 600 nm de longitud de onda. Las suspensiones deben tener entre 0,5 y 1 de densidad óptica.

Una vez medida su absorbancia, y dependiendo de la misma, se realizará la estandarización de las soluciones de manera que: si tienen alrededor de 0,5 de absorbancia se mezcla 75 µL de la mezcla de células inicial con 75 µL de CSB; si tienen alrededor de 0,8 de absorbancia, se mezclan 50 µL de la mezcla de células inicial con 100 µL de CSB; y si tienen alrededor de 1 de absorbancia, se mezclan 37,5 µL de células con 112. 5 µL de CSB:

A estos 150 μL de células estandarizadas se les añaden 7,5 μL de proteasa K a una concentración de 20 mg/mL, para que en los bloques de agarosa se encuentre a una concentración final de 0,5 mg/mL. A continuación, se sigue con la adición de 150 μL de agarosa al 2% disuelta en TE (1 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8) y suplementada con SDS. La agarosa diluida debe encontrarse a 55°C, para que se mantenga fundida y no lise las células bacterianas. Tras mezclar la agarosa con la solución de células se deposita en el molde y se deja solidificar.

Una vez ha polimerizado se deposita el bloque de agarosa en un tubo eppendorff de 1,5 mL al que se le añaden 500 μL de tampón de lisis (1% lauril sarcosina; 0,05 M Tris-HCl (pH 8); 0,05 M EDTA (pH 8); suplementado, justo en el momento de utilizarla, con 0,1 mg/mL de proteasa K). Después se incuba el bloque durante 3h o toda la noche en la solución de lisis a 50°C. Una vez transcurrido el tiempo se elimina el tampón de lisis y se pasa el bloque a un falcon de 15 mL para lavar los bloques y eliminar los restos de solución que puedan quedar. Se realizan dos lavados de 30 minutos cada uno con agua, seguidos de dos lavados, de 30 minutos cada uno, en TE.

Una vez realizados los lavados se pueden guardar los bloques en TE a 4°C hasta que se vaya a realizar el proceso de digestión y electroforesis.

5. 3. 6. 2. Digestión del ADN en los bloques de agarosa

Cortar el bloque en tres fragmentos iguales. Seguidamente preincubar uno de los fragmentos con 200 μL de tampón (1x) de la enzima con la que se va a digerir durante 15 minutos. A continuación, se digiere el bloque utilizando la enzima XbaI, en el caso del marcador de pesos molecular (a una concentración final de 0.4 U/ μL , de manera que si la enzima está a 10 U/ μL se echa 8 μL de enzima con 20 μL de tampón y 172 μL de agua) ó nucleasa S1 en el caso de las muestras problema a analizar (a una concentración de 0,05 U/ μL , de manera que si la enzima está a 1000 U/ μL se mezclan 0,5mL de tampón con 4. 5 mL de agua y 0. 25 μL de nucleasa S1). Posteriormente se incuban los bloques de agarosa a 37°C durante 3-4 horas (o toda la noche), en el caso de la digestión con XbaI, o durante 15 minutos, en el caso de la digestión con nucleasa S1.

Una vez realizadas las incubaciones con las enzimas se extrae el fragmento y se deposita en un tubo limpio y se realizan dos lavados con 1 mL de CSB frío. Seguidamente se añade 1 mL de TE.

5. 3. 6. 3. Preparación del gel de agarosa y electroforesis en campo pulsado

Para la preparación del gel se utiliza agarosa ultra pura (Pulse Field Certified Agarose; Bio-Rad) al 1% y TBE al 0,5x. Una vez elaborado el gel de agarosa se introducen los trozos de los bloques ya digeridos en los pocillos del gel. Una vez introducidos se sella con agarosa ultra pura (Pulse Field Certified Agarose; Bio-Rad) al 1% y TBE 0.5x. Esta agarosa debe estar a 55°C, para que no deshaga los bloques. Una vez sellados los pocillos se realiza la electroforesis en campo pulsado utilizando las siguientes condiciones: tiempo inicial: 2,2 segundos; tiempo final: 63,8 segundos; ratio inicial: 1,0; voltaje: 6 V/cm; y duración de la migración: 21 horas.

La temperatura a la que se realiza el campo pulsante debe ser 14°C y la bomba debe mantenerse al 80% de su velocidad máxima. Una vez finalizada la electroforesis se procede a la tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 µL/mL de TBE) durante 30 minutos en agitación muy suave. Seguidamente se realizan dos lavados de 30 minutos cada uno con agua.

Tras realizar la tinción, y antes de proceder a la realización del Southern, se captura una imagen en el transiluminador colocando al lado del gel una regla para que posteriormente nos sirva como referencia.

5. 3. 7. Hibridación de ácidos nucleicos mediante Southern blot

Tras el PFGE, las moléculas de ADN separadas se desnaturalizan mientras permanecen en el gel de agarosa, impregnando éste con una disolución alcalina (NaOH 0,5 M). Tras la neutralización de ésta (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 y NaCl 1,5 M), el DNA monocatenario resultante se transfiere a la superficie de una membrana de nailon (*Nylon Membranes*, positively charged de Roche), realizando así una copia o "calco" (la traducción literal del inglés blot es "secante"). Al igual que la aplicación de un secante a un papel con la tinta húmeda transfiere una réplica de la imagen del papel al secante, se produce el "calco" del ADN en el gel a la membrana de nailon,

conservando ésta la distribución espacial de los fragmentos de ADN conseguida en el gel como resultado de la electroforesis.

Una vez transferidos los ácidos nucleicos a la membrana de nailon se fija la misma con radiación ultravioleta durante 1 minuto. A continuación la membrana se incuba con una sonda marcada, utilizando para su elaboración el kit comercial *PCR DIG Labeling Mix* de la casa comercial Roche. Durante la incubación la sonda se va hibridando a las moléculas de ADN de cadena sencilla de secuencia complementaria, o a aquellas que poseen un alto grado de similitud. Para realizar el procedimiento de hibridación se ha utilizado el kit comercial *Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit (for chemiluminescent detection with CSPD)* de Roche. Finalmente, la sonda unida al fragmento de ADN se visualiza mediante una exposición a una película de rayos X.

5. 3. 8. PCR en tiempo real

En este proyecto de tesis analizamos la expresión génica relativa de un gen específico implicado en la resistencia a colistina (*pmrH*), utilizando como control endógeno el gen *recA*. Este análisis se realizó en todos mutantes seleccionados *in vitro* y se utilizó como control la cepa de colección de la que procedían (*Escherichia coli* ATCC 25922). Una vez obtenido el ARN de las cepas se realizó una retrotranscripción para transformar el mismo en ADN complementario (ADNc). Para ello se utilizó el kit comercial *PrimeScript TM RT Reagent Kit (Perfect Real Time)* de *Takara Clontech* siguiendo las recomendaciones del fabricante.

A continuación, se realizó el proceso de qPCR utilizando el kit comercial *SYBER green PCR master mix of Takara Clontech*, y utilizando los cebadores a una concentración de 0.15 μ M, que están detallados en la tabla 6. La temperatura de fusión de los oligonucleótidos utilizada es de 57.5°C. Este procedimiento se realizó en el aparato *Applied Biosystems 7500 sequence detector system*. En este experimento se analizó la sobreexpresión relativa del gen *pmrH* en función del gen endógeno *recA*, utilizando como control positivo la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Para la determinación de la sobreexpresión se realizaron dos réplicas biológicas de cada cepa analizada y dos réplicas técnicas de cada cepa, en cada

réplica biológica. Posteriormente se llevó a cabo el tratamiento de los datos, así como su representación gráfica.

GENES/ REFERENCIA	CEBADORES Y PROGRAMACIÓN
<i>pmrH (E.coli)</i> (Este trabajo)	5'-ATT GGC AAG GGC GAT GAA-3' 5'-AGG CGT GAC CAT CAG CGT AT-3' T ^a annealing: 57,5°C
<i>recA (E.coli)</i> (Este trabajo)	5'-GCG CGT TAC CAC CGG TAG TG-3' 5'-GTA TGA TGA GCC AGG CGA TGC-3' T ^a annealing: 57,5°C

Tabla 6: Tabla resumen de los genes cuantificados por qPCR en *Escherichia coli*.

5. 3. 9. Trasplante de mutaciones por doble recombinación

Para realizar el trasplante de mutaciones por doble recombinación desde un fondo genético mutante a una cepa salvaje (*E. coli* J53) seguimos el protocolo descrito por Philippe y colaboradores en 2004. De manera que en primer lugar realizamos la transformación de células de *Escherichia coli* K12 SM10 (λ pir) con el plásmido *psD132* ligado con los insertos a trasplantar, que previamente habían sido amplificados con una polimerasa correctora de errores (*Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* de *BioLabs NewEngland*), utilizando los cebadores presentes en la tabla 7 a una concentración de 0. 5 μ M. Antes de realizar la ligación de los fragmentos al plásmido, ambos, insertos y plásmidos, fueron digeridos con las enzimas Sac I y Sal I (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante.

GEN/ REFERENCIA	SECUENCIA/ PROGRAMACIÓN	TAMAÑO AMPLICÓN (pb)
FULLAB (Este trabajo)	5'- ACC CCA ACC TGC GAC ACT AAC GA-3' 5'- GCT GGT CGA GAG CTC GCA GAA TC-3' 98°C, 30 seg. ; 35 x (98°C, 10 seg. ; 61,8°C, 30 seg. ; 72°C, 3 min.); 72°C, 5 min.	2600
BM2FR (Este trabajo)	5'- GCT GGT CGA GAG CTC GCA GAA TC-3' 5'-ACA AAG TCG ACG GGC TGG ATG TC-3' 98°C, 30 seg. ; 35 x (98°C, 10 seg. ; 61. 8°C, 30 seg. ; 72°C, 3 min.); 72°C, 5 min.	2000

Tabla 7: Tabla resumen de los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos *FullAB* y *BM2FR*.

Tras realizar una selección de los transformantes en medio LB agar suplementado con 10 mg/L de cloranfenicol, se seleccionaron un par de colonias para, posteriormente, conjugadas con una cepa recA+ (J53), en la que no se puede replicar el plásmido y es necesaria su inserción en el genoma para su conservación. Una vez obtenidos los conjugantes, en medio sólido suplementado con 100 mg/L de azida y 10 mg/L de cloranfenicol, obtenemos los recombinantes simples. A continuación, seleccionamos una colonia y la disgregamos en 100 µL de LB líquido para posteriormente cultivarla en una placa de LB sin NaCl y suplementada con el 5% de sacarosa. De esta manera obtenemos los doble recombinantes. Finalmente, con el objetivo de recuperar solo los recombinantes que han incorporado el fragmento hacemos una dilución 0,5 McFarland del material bacteriano obtenido en la placa con sacarosa y cultivamos por un lado en medio selectivo suplementado con colistina (2 mg/L) y por otro lado en medio selectivo suplementado con cloranfenicol (10 mg/L), seleccionando aquellas colonias resistentes a sacarosa y a colistina y sensibles a cloranfenicol.

5.4. TÉCNICAS BIOINFORMÁTICAS

En los mutantes espontáneos resistentes a colistina seleccionados *in vitro* que no presentaran polimorfismos en el sistema *pmrAB* o el gen *mgrB*, se realizó el análisis completo del genoma, con el objetivo de descifrar nuevos posibles determinantes de resistencia a colistina. Para ello, a partir de un cultivo puro se realizó la extracción de ADN genómico de alta calidad, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.3.1.1, utilizando el kit de *Quiagen*.

El ADN genómico fue enviado al Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia (STAB) de la UEx, así como al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL). Al último además se le envió el ADN genómico de la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 presente en nuestro laboratorio.

El genoma del mutante fue secuenciado utilizando dos tecnologías de secuenciación distintas: Ion Torrent (en el STAB de la UEx) e Illumina (en el Laboratorio de Biología Molecular del ITACyL). Por otro lado el genoma de la cepa de referencia fue secuenciado solo con la tecnología Illumina.

El ensamblado del genoma fue realizado por el STAB y/o el ITACyL. Posteriormente los genomas fueron anotados con el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology versión 2.0) (rast.nmpdr.org). Seguidamente se realizó el estudio de polimorfismos existentes entre el mutante espontáneo y la cepa de referencia. Para ello se comparó el genoma del mutante secuenciado con el Illumina con el genoma de la cepa de referencia (tanto la de nuestro laboratorio, secuenciada con la tecnología Illumina, como la de la base de datos Pubmed) y con el propio mutante secuenciado con la tecnología Ion Torrent. Así mismo el mutante seleccionado con la tecnología Ion Torrent fue comparado con el genoma de nuestra cepa de referencia analizado con la tecnología Illumina.

Por otro lado se calculó el promedio de nucleótidos idénticos entre el genoma del mutante secuenciado con las dos tecnologías, el genoma de la cepa de referencia secuenciado con tecnología Illumina y el genoma de la cepa de referencia de la base de datos utilizando el programa ANI Calculator (www.ezbiocloud.net/tools/ani) (Lee *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2017).

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Mecanismos de resistencia a colistina en un modelo *in vitro* de *Escherichia coli*

6.1. Mecanismos de resistencia a colistina en un modelo *in vitro* de *Escherichia coli*

6.1.1. Cepario

A partir de la cepa de colección *Escherichia coli* ATCC 25922 se aislaron y seleccionaron diez mutantes espontáneos e independientes resistentes a colistina que se nombraron como: CR1, CR2, CR3, CR4, CR5, CR6, CR7, CR8, CR9 y CR10.

6.1.2. Sensibilidad antimicrobiana

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la colistina y para la polimixina B, obtenida mediante el método de microdilución en caldo, previamente descrito en el apartado 5.2.2.1. de materiales y métodos, tanto para los mutantes espontáneos resistentes a colistina como para la cepa sensible de la que proceden se detallan en la tabla 9.

CEPA	CMI (mg/ L)	
	COLISTINA	POLIMIXINA B
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5	1
CR1	8	4
CR2	4	16
CR3	4	8
CR4	4	8
CR5	2	8
CR6	2	8
CR7	4	8
CR8	4	8
CR9	8	8
CR10	8	8

Tabla 9: Concentración mínima inhibitoria para la colistina y la polimixina B en los mutantes espontáneos e independientes resistentes a colistina procedentes de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

Como se aprecia en la tabla X, todos los mutantes seleccionados presentan una CMI superior a 2 mg/L de colistina, solo dos de ellos (CR5 y CR6) presentaron una CMI igual a 2 mg/L de colistina. Además, todos los mutantes resistentes a colistina presentan una resistencia cruzada a la polimixina B, presentando una CMI superior a 2 mg/L de polimixina B. Con la intención de comparar la CMI con otro método, así como de observar fenómenos de heterorresistencia, se utilizaron E- test (Figura 23), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.2.1 de materiales y métodos.

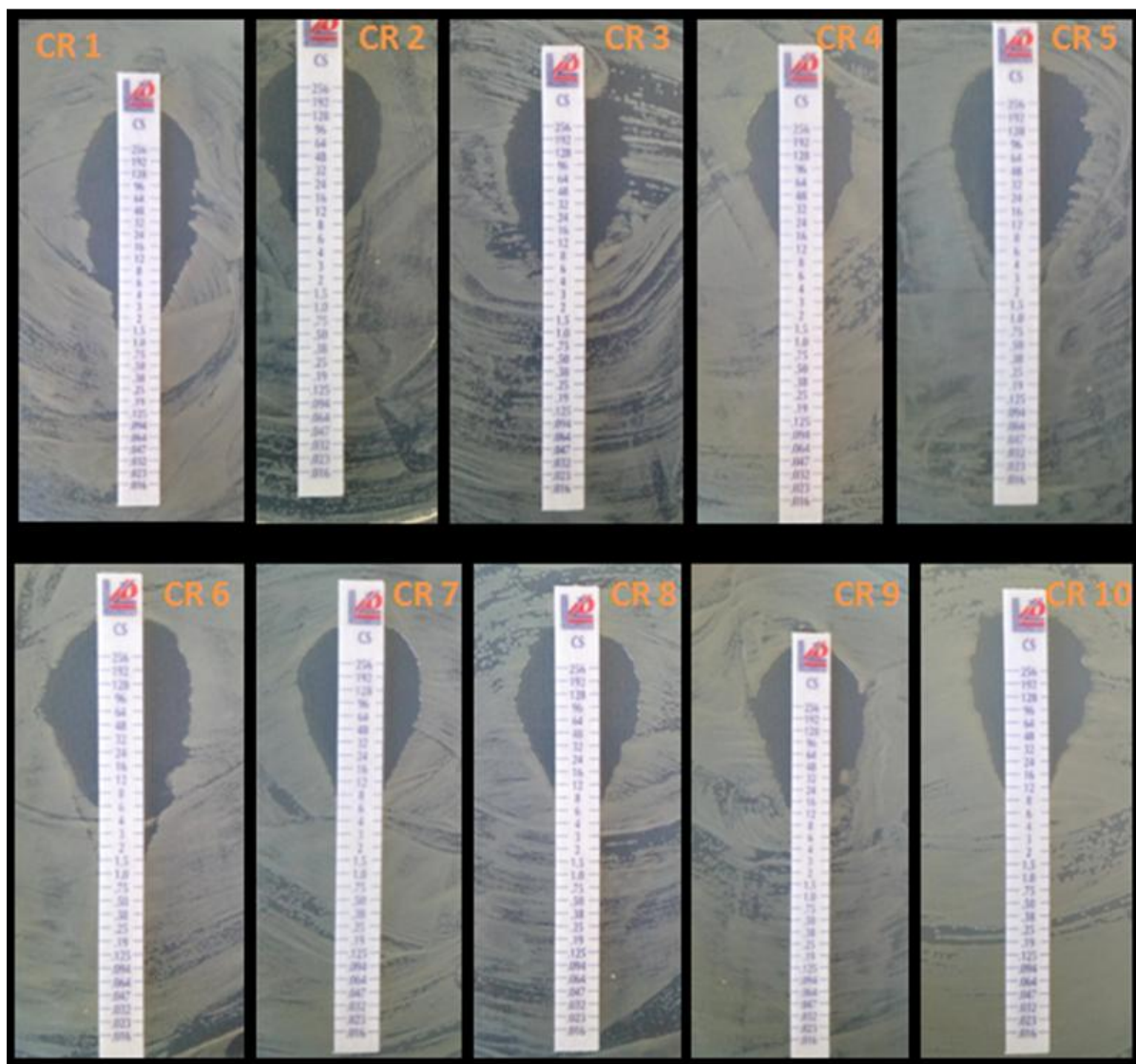


Figura 23: E- test de colistina realizado a los mutantes espontáneos resistentes a colistina (CR1- CR10).

Tal y como se observa en la figura 24, en los mutantes CR5 y CR6 se aprecia un crecimiento de menor densidad en el rango de 2 a 6 mg/L de colistina, lo que puede ser compatible con el fenómeno de heterorresistencia.

6.1.3. Crecimiento bacteriano

Tras determinar el crecimiento bacteriano de los diez mutantes espontáneos resistentes a colistina y de su cepa de procedencia, *Escherichia coli* ATCC 25922, en medio LB en presencia de colistina a 2 mg/L y en ausencia de dicho antibiótico, se observa que en todos los casos los mutantes crecen de manera similar tanto en el medio suplementado con 2 mg/L de colistina como en el medio sin antibiótico (Figura 24).

Por otro lado, y siguiendo la técnica descrita en el apartado 5.2.3.1.2. de materiales y métodos se determinó el tiempo de generación de los mutantes espontáneos cuando crecen en un medio LB suplementado con 2 mg/L de colistina, así como cuando crecen en medio LB sin antibiótico. Además, se calculó el tiempo de generación de la cepa de la que proceden (*E.coli* ATCC 25922). Para determinarlo se utilizó la ecuación de Monod y colaboradores, descrita en 1949, teniendo en cuenta el número de colonias obtenidas en la fase exponencial del crecimiento de cada cepa.

Como se observa en la tabla 9 el tiempo de generación de los mutantes (salvo en los mutantes CR7 y CR10) es menor cuando crecen con colistina a cuando crecen sin el antibiótico. Por otro lado, en comparación con la cepa de la que proceden se observa que, en ausencia de antibiótico la cepa parental (*Escherichia coli* ATCC 25922) presenta un tiempo de generación más bajo.

Solo uno de los mutantes (CR4), presentó un tiempo de generación notablemente menor que la cepa de procedencia.

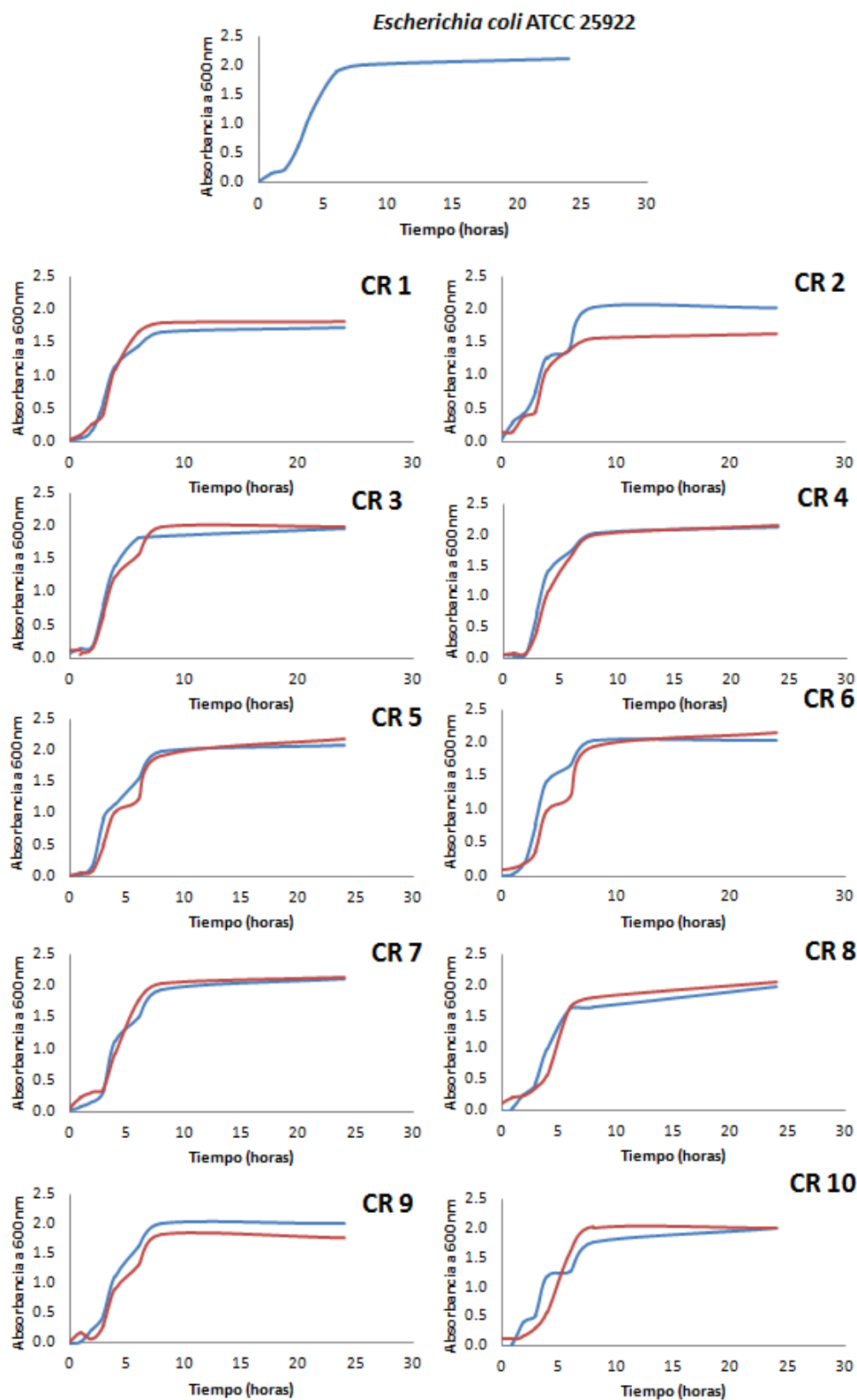


Figura 24: Curvas de crecimiento de los mutantes espontáneos resistentes a colistina. El crecimiento en medio sin antibiótico se representa con el color azul, mientras que el crecimiento en presencia de colistina, a una concentración de 2 mg/L, se representa con el color rojo.

CEPA	TIEMPO DE GENERACIÓN (min)	
	SIN COLISTINA	CON 2 mg/L COLISTINA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20,81	-
CR1	26,66	24,32
CR2	26,66	24,75
CR3	25,58	24,84
CR4	22,73	17,77
CR5	23,50	23,15
CR6	22,07	20,33
CR7	21,94	31,51
CR8	22,29	20,33
CR9	23,10	22,95
CR10	22,36	28,18

Tabla 9: Tiempo de generación, expresado en minutos, de los mutantes, en presencia y ausencia de colistina, y de la cepa “madre” de la que proceden, en ausencia de colistina.

6.1.4. Mecanismos de resistencia a colistina

A todos los mutantes espontáneos resistentes a colistina se les amplificaron y secuenciaron: los genes *pmrA*, *pmrB* y *mgrB*. Todos los mutantes menos el denominado como CR4 presentaron mutaciones en el sistema *pmrAB* (tabla 11), mientras que no se observaron variaciones en ningún caso para *mgrB*. La mayor parte de los polimorfismos estuvieron localizados en *pmrB*, solo una de las cepas, CR2, presentó un polimorfismo en *pmrA*.

El polimorfismo que aparece con mayor frecuencia en nuestros mutantes espontáneos resistentes a colistina es V161G, localizado en *pmrB*, seguido del polimorfismo V133F, localizado también en *pmrB*. De todos los polimorfismos hallados solo uno de ellos (V161G, *pmrB*) estaba previamente descrito, el resto de polimorfismos no se han descrito anteriormente en la bibliografía o afectan a un alelo distinto al previamente descrito (R81S en *pmrA* y L14Q en *pmrB*).

CEPA	POLIMORFISMOS EN <i>pmrAB</i>
CR1	D312N (<i>pmrB</i>)
CR2	R81S (<i>pmrA</i>)
CR3	L14Q (<i>pmrB</i>)
CR4	NINGUNO
CR5	V161G (<i>pmrB</i>)
CR6	V161G (<i>pmrB</i>)
CR7	V133F (<i>pmrB</i>)
CR8	Q99P (<i>pmrB</i>)
CR9	V133F (<i>pmrB</i>)
CR10	V161G (<i>pmrB</i>)

Tabla 10: Polimorfismos encontrados en el sistema *pmrAB* en los mutantes espontáneos resistentes a colistina.

6.1.5. Mutagénesis dirigida de los polimorfismos encontrados

Los polimorfismos encontrados en el sistema *pmrAB* de las cepas CR1, CR2, CR3, CR7, CR8, CR9 y CR10, fueron transferidos mediante doble recombinación desde el plásmido suicida *pSD132* a una cepa *recA* +, *Escherichia coli* J53, sensible a colistina. En todos los casos se obtuvieron dobles recombinantes en medio LB con sacarosa al 10%, El grado de resistencia a colistina conferida varió en función del polimorfismo introducido (Tabla 11).

CEPA	LOCALIZACIÓN	CMI COLISTINA (mg/L)
<i>Escherichia coli</i> J53	-	0.5
<i>E. coli</i> J53 + D312N (<i>pmrB</i>)	CR1	1
<i>E. coli</i> J53 + R81S (<i>pmrA</i>)	CR2	4
<i>E. coli</i> J53 + L14Q (<i>pmrB</i>)	CR3	1
<i>E. coli</i> J53 + V133F (<i>pmrB</i>)	CR7 y CR9	1
<i>E. coli</i> J53 + Q99P (<i>pmrB</i>)	CR8	1
<i>E. coli</i> J53 + V161G (<i>pmrB</i>)	CR5, CR6 y CR10	2

Tabla 11: Polimorfismos transferidos por doble recombinación y CMI de colistina.

6.1.6. Expresión del gen *pmrH*

Como se observa en la figura 25 todos los mutantes espontáneos resistentes a colistina presentaron una sobreexpresión relativa del gen *pmrH* con respecto al gen endógeno *recA* en comparación con la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

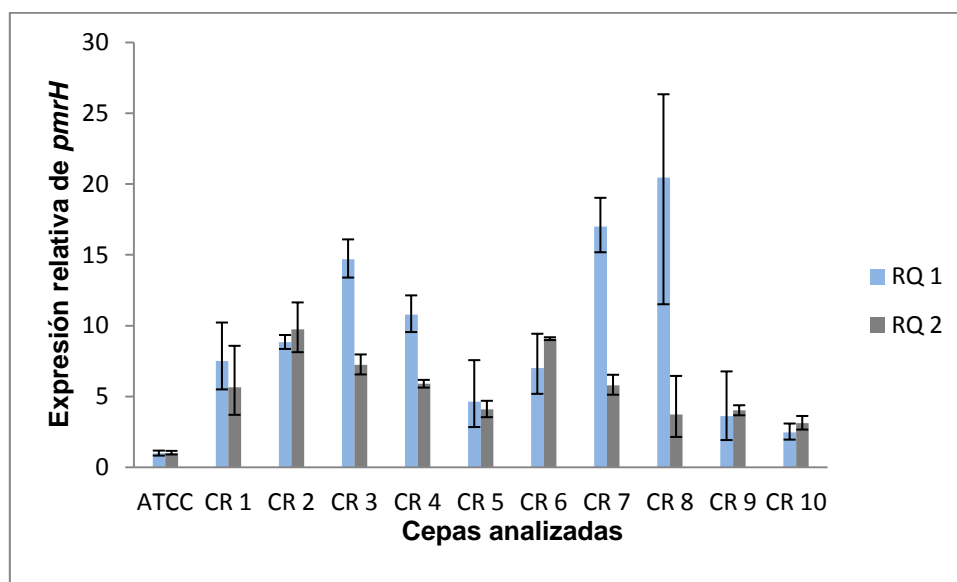


Figura 25: Representación gráfica de la sobreexpresión relativa del gen *pmrH* con respecto al gen *recA* en los mutantes espontáneos resistentes a colistina seleccionados *in vitro*. Representación de las dos réplicas biológicas del experimento, donde RQ 1 representa al primer experimento, RQ 2 representa al segundo experimento y ATCC representa la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

6.1.7. Estudio bioinformático del genoma del mutante CR4

Dado que el mutante CR4 no presenta ningún polimorfismo en el sistema *pmrAB* o el gen *mgrB*, se analizó el genoma completo del mismo. Tras realizar el análisis se localizaron los polimorfismos con respecto a la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922. Localizando un único polimorfismo presente en el mutante que no estuviera presente en la cepa de referencia de nuestro laboratorio secuenciada con tecnología Illumina, ni en el genoma de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 que está depositado en la base de datos.

El polimorfismo se localizó en un plásmido de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, generando un cambio sinónimo e independiente de uso de codones, afectando a una zona palíndroma (Tabla 13).

Además de este polimorfismo puro, encontramos otros dos polimorfismos mixtos, uno localizado en la posición 1103051 en el que se produce el cambio A25V en la proteína hipotética WP001519008; y otro situado en una región intergénica implicada en el transporte de Glu/Asp y Sel1 (Tabla 12).

Posición	Polimorfismo	Secuencia	Proteína
2508	C → T	GAGCCATTATCACTTAATAAAAAGAATAGG T ATCT GGTCAGATGAAATAAAAATACATTCC	mccB
1103051	G → A	TTACTGTTTCAGCCCTGAGTTGGTGGCTCTG G CT GGAGTGAGATAGCCCACATCTAACAAATG	Proteína hipotética WP001519008
2291719	A → G	AGGTCCGATAAGGCGTTTACGCCGCATCCGAC ATCAACGCCTGATGCGAC G CTTGCCGCGT	Transporte de Glu/Asp y Sel1
2291740	C → G	CCGCATCCGACATCAACGCCTGATGCGACG C T TGCCGCGTCTTATCAGGCCTACGCCAGAC	
2291787	GTA → TCC	GGCCTACGCCAGACAGCGCAATAGCCTGATGT AGCGTGATTT T GTAGGTCCGATAAGGCG	

Tabla 12: Resumen del análisis bioinformático del mutante CR4 comparado con la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922.

Utilizando la herramienta bioinformática ANI Calculator comprobamos que el genoma del mutante CR4, con una longitud de 5156537pb, presenta un porcentaje en GC de 50.47%. Además, el mutante CR4 presenta una identidad promedio de los nucleótidos del 99.97% con respecto a su cepa de referencia.

6.1.8. Estabilidad del genotipo

Teniendo en cuenta los criterios establecidos en el apartado 5.2.4 de materiales y métodos comprobamos que la mayoría de los genotipos presentes en los mutantes espontáneos resistentes a colistina presentan una estabilidad por encima del 60%, tras ocho ciclos de crecimiento sin colistina, situándose en la categoría A (muy estables) (Figura 26).

Tan solo tres de las cepas (CR5, CR6 y CR10), todas ellas con el polimorfismo en *pmrB* (V161G), presentan una estabilidad inferior al 10%, tras ocho ciclos de crecimiento sin antibiótico, situándose en la categoría C, inestables). Además, dos de las cepas inestables, CR5 y CR6, presentaron un comportamiento compatible con heterorresistencia a colistina mediante el método del E-test.

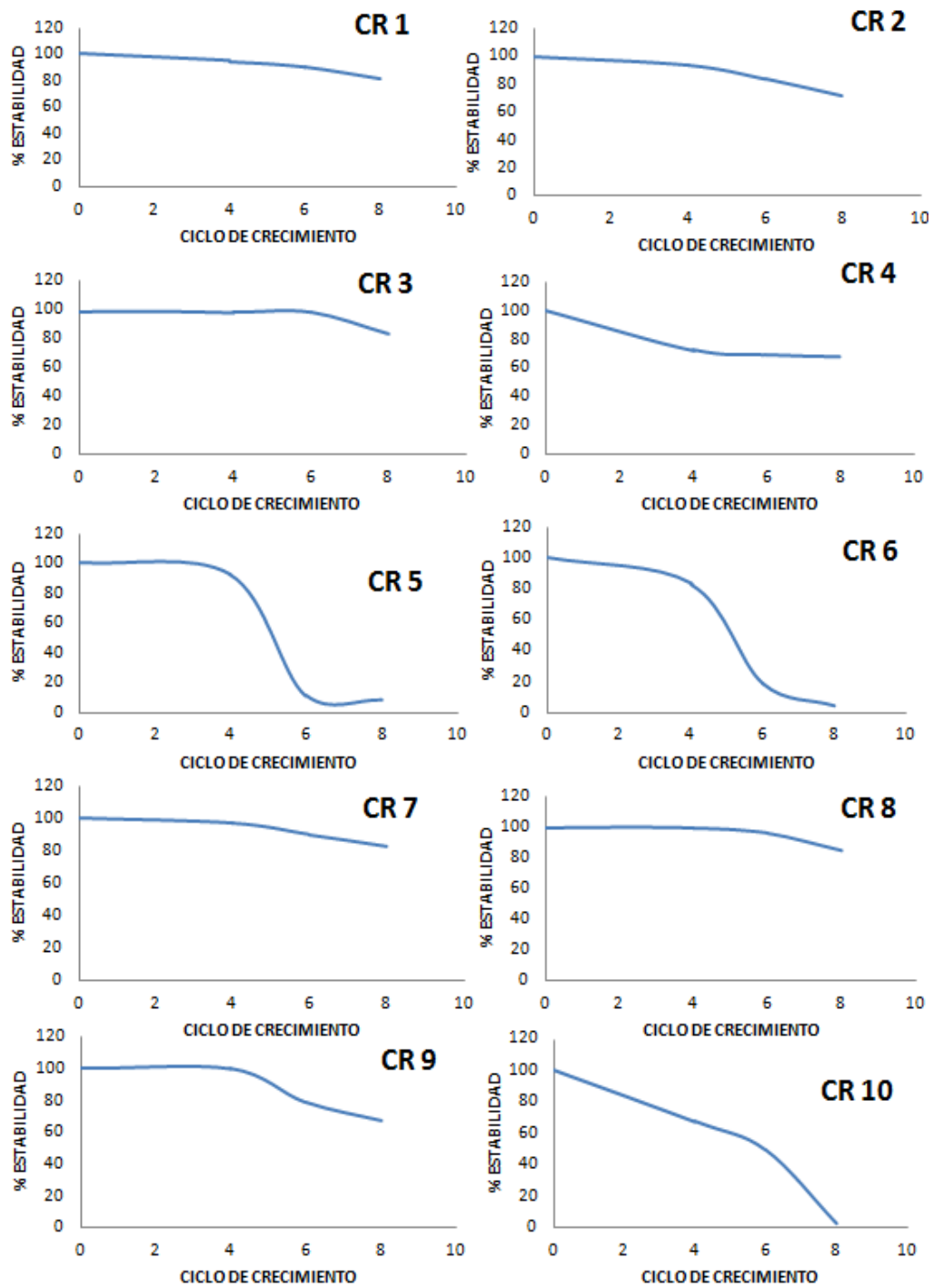


Figura 26: Representación gráfica de la estabilidad del genotipo de los mutantes espontáneos resistentes a colistina.

CAPÍTULO II

Mecanismos de resistencia a colistina en cepas de *Escherichia coli* de origen animal.

6.2. Mecanismos de resistencia a colistina en cepas de *Escherichia coli* de origen animal

6.2.1. Ceparario

En esta investigación se han estudiado un total de 80 cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina de origen animal, aisladas en VISAVET durante el período de tiempo comprendido entre 2011 y 2016. La mayoría de las cepas resistentes a colistina proceden de heces de pavo (46,75 % de los casos) o de heces de porcino de engorde (47,75 % de los casos). Tan solo un 7,5 % de las cepas proceden de heces de bovino.

6.2.2. Sensibilidad antimicrobiana

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la colistina y para la polimixina B utilizando el método de microdilución en caldo, previamente descrito en el apartado 5.2.2.1. de materiales y métodos. Como apreciamos en los anexos, todas las cepas presentan una CMI de colistina superior a 2 mg/L. Por otro lado la mayoría de las cepas presentan también una CMI de polimixina B superior a 2 mg/ L, salvo once cepas (Eco 21, Eco 24, Eco 29, Eco 68, Eco 71, Eco 78, Eco 81, Eco 84, Eco 86, Eco 90 y Eco 91) que muestran una resistencia intermedia a polimixina B, con una CMI de 2 mg/L.

6.2.3. Crecimiento bacteriano

Se determinó el crecimiento de todas las cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina en medio LB en presencia de colistina (a una concentración de 2 mg/L), así como en ausencia del antibiótico. Dado que el ceparario está compuesto por 80 cepas, y que la superposición de todos los crecimientos bacterianos supondría una gráfica incomprensible, en la figura 29 se muestra la representación gráfica del crecimiento de seis cepas, que representan los genotipos presentes en nuestro ceparario: Eco 1 (presencia de *mcr-1*); Eco 9 (presencia de *mcr-1* y polimorfismo en el sistema *pmrAB*); Eco 36 (presencia de *mcr-1* y *mcr-4*); Eco 37 (presencia de polimorfismos en el sistema *pmrAB*);

Eco 46 (presencia de *mcr-1* y *mcr-3*); y Eco 92 (presencia de *mcr-4* y polimorfismos en el sistema *pmrAB*).

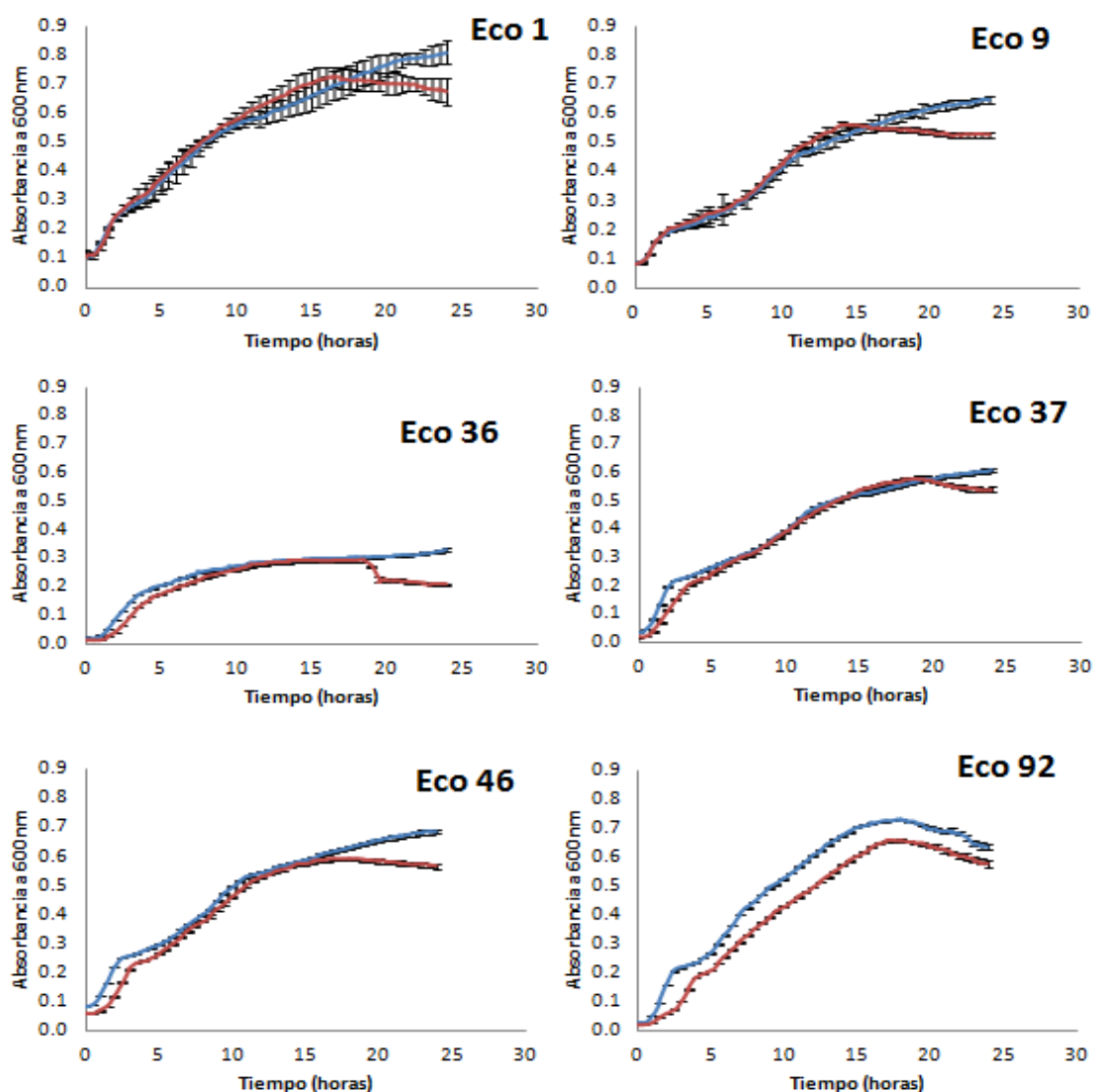


Figura 27: Representación gráfica del crecimiento bacteriano de las cepas Eco 1, Eco 9, Eco 36, Eco 37, Eco 46 y Eco 92 en medio LB en presencia de colistina, a una concentración de 2mg/L y sin antibiótico. Donde el color azul representa el crecimiento sin antibiótico y el color rojo el crecimiento en medio con antibiótico.

La representación gráfica del crecimiento del resto de cepas se encuentra en el apartado de anexos. En todas las cepas se observa que en todas las cepas, a partir de las 15 horas de crecimiento en medio LB suplementado con 2 mg/L de colistina comienza a hacerse patente la fase de muerte celular. Por otro lado, en dieciséis de las cepas (Eco 33, Eco 45, Eco 51, Eco 52, Eco 56, Eco 60, Eco 66, Eco 69, Eco 70, Eco 71, Eco 74, Eco 75, Eco 81, Eco 82, Eco 83 y Eco

87) se observa una fase de latencia o adaptación más larga cuando las cepas crecen en presencia de antibiótico (Ver figuras en el apartado de anexos).

6.2.4. Mecanismos de resistencia a colistina

En este cepario observamos cepas que presentan distintos determinantes que confieren resistencia a colistina. Por un lado observamos la presencia de polimorfismos en el sistema *pmrAB* y por otro la presencia de genes de tipo *mcr*, los cuales aparecen solos o combinados con polimorfismos en el sistema *pmrAB* o con otros genes *mcr* (Ver Anexo I).

6.2.4.1. Polimorfismos en el sistema *pmrAB*

En los aislados clínicos de *Escherichia coli* de este cepario, en la mayoría de ocasiones (n=9), los polimorfismos en el sistema *pmrAB* aparecen combinados con la presencia de genes tipo *mcr-1* (salvo en la cepa Eco 37, que aparece el polimorfismo G 53 R en *pmrA*, de manera aislada). En las otras 8 cepas solo en dos de ellas (Eco 8 y Eco 9) el gen *mcr-1* está localizado en el cromosoma, aunque inicialmente se había descrito su localización plasmídica (Quesada *et al.*, 2015), en las seis restantes (Eco 26, Eco 39, Eco 43, Eco 55, Eco 61 y Eco 62) está localizado en un plásmido movilizable en todos los casos salvo en la Eco 26. En estas cepas el tamaño predominante del plásmido es, aproximadamente, de 33.3 Kb, salvo en la cepa Eco 61 que está localizado en un plásmido movilizable de 216.9 Kb.

6.2.4.2. Genes *mcr*

Por otro lado, cabe destacar que en la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* que conforman este cepario encontramos la presencia de genes de tipo *mcr* (n=75).

Dentro de los genes *mcr* descritos en la bibliografía, el gen más predominante en este cepario es el *mcr-1* (n=74). Además de los descritos en el apartado

6.2.4.1. de resultados, que aparecen en combinación con polimorfismos en el sistema *pmrAB*, también encontramos la presencia del gen *mcr-1* en combinación con otros determinantes de tipo *mcr*, en concreto, con *mcr-3* (en la cepa Eco 46) (Hernández *et al.*, 2017) y *mcr-4* (en las cepas Eco 36 y Eco 81). En estos casos el gen *mcr-1* está localizado en un plásmido de distinto peso molecular (244 Kb, en Eco 46; 54 Kb, en Eco 36; y 33 Kb, en Eco 81). Cuando el gen *mcr-1* aparece en combinación con *mcr-3*, en la cepa Eco 46, no es movilizable por conjugación ni por transformación. Además, tal y como se observa en la figura 28, al realizar el campo pulsado y la hibridación de la membrana resultante observamos que ambos genes estaban presentes en plásmidos de distinto tamaño.

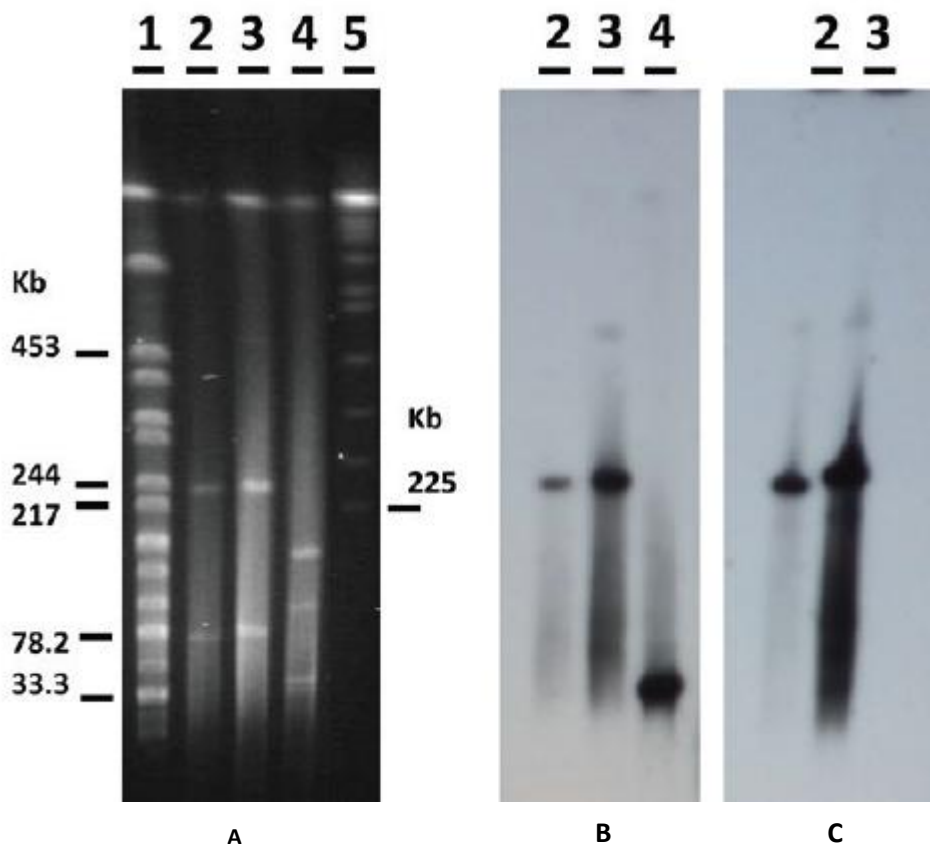


Figura 28: Campo pulsante e hibridación de la membranas con sondas para los genes *mcr-1* y *mcr-3*. Donde A representa el campo pulsante; B representa la hibridación de *mcr-1*; y C representa la hibridación de *mcr-3*. Calle 1: *Salmonella Baraenderup* digerida con XbaI, como marcador de pesos moleculares; Calle 2 y 3: Eco 46 digerida con nucleasa S1; Calle 4: Cepa de *Escherichia coli* portadora de *mcr-1*; Calle 5: *Saccharomyces cerevisiae* digerido con nucleasa S1, como segundo marcador de pesos moleculares. Las sondas fueron marcadas utilizando el kit comercial PCR DIG Labeling Mix (Roche ®).

Por otro lado, en los casos que aparece combinado con el gen *mcr-4*, *mcr-1* es movilizable por conjugación.

Cabe destacar que también se encontraron cepas (n = 62), que presentaron el gen *mcr-1* como único determinante de resistencia a colistina, de las cuales 19 no movilizan el plásmido portador del gen *mcr-1*, en el resto de los casos se moviliza por conjugación o transformación (Eco 32, Eco 54, Eco 56 y Eco 84).

El gen *mcr-4* está presente en tres cepas (Eco 36, Eco 81 y Eco 92), en las dos primeras, como ya se comentó anteriormente aparece en combinación con el gen *mcr-1*, mientras que en la cepa Eco 92 aparece en combinación con polimorfismos en el sistema *pmrAB*. En este último caso el plásmido no es movilizable por conjugación, pero sí por transformación.

Por otro lado, la escasa presencia de ISAPL-I en las cepas portadoras del gen *mcr-1* parece indicar que no es esencial para la expresión de la resistencia a colistina, ya que la mayoría de las cepas no lo portan, estando presente en un bajo porcentaje de las cepas portadoras de *mcr-1* (n=8: Eco 26, Eco 27, Eco 34, Eco 41, Eco 46, Eco 52, Eco 59 y Eco 91).

6.2.5. Mecanismos de resistencia a betalactámicos

Teniendo en cuenta los trabajos de investigación de otros autores, que describen la presencia de genes *mcr* y betalactamasas en un mismo plásmido en cepas de *Escherichia coli* se determinó mediante PCR la presencia de las mismas, así como el índice de conjugación. Tal y como se observa en los anexos solo en seis cepas no amplificaron con los cebadores diseñados por Monstein y colaboradores en 2007, de los cuales solo uno de ellos no movilizó por conjugación (Eco 64). En las otras cinco cepas (Eco 34, Eco 43, Eco 44, Eco 48 y Eco 68) se movilizó un plásmido que confiere resistencia a los betalactámicos, lo que parece indicar que otra betalactamasa está presente en estas cepas. Por general la betalactamasa más predominante en nuestro cepario es TEM, presente en 61 de las cepas de la colección, de las cuales aparece sola (n = 33) o en combinación con CTXM (n = 11) ó SHV (n = 17). En 11 de las 61 no se produce conjugación, de manera que en 4 de los casos no hay movilización por conjugación cuando aparece en combinación con CTXM,

en 5 de los casos cuando aparece en combinación con SHV y en 2 de los casos cuando TEM aparece sola.

Además observamos la presencia de CTXM sola en diez cepas de *Escherichia coli* (Eco 27, Eco38, Eco 39, Eco 41, Eco 43, Eco 50, Eco 53, Eco 58, Eco 87 y Eco 92), de las cuales solamente en tres de ellas no se produce movilización del plásmido por conjugación (Eco 27, Eco, 50 y Eco 53).

Por otro lado, encontramos la presencia de SHV, de manera aislada, en 3 cepas de *Escherichia coli* (Eco 29, Eco 45 y Eco 90), movilizable en todos los casos por conjugación.

Teniendo en cuenta la CMI de colistina de los conjugantes obtenidos del ensayo de conjugación para los determinantes de resistencia a betalactámicos y comparando los índices de conjugación de los determinantes de resistencia a betalactámicos y a colistina se observa que en cinco cepas (Eco 1, Eco 34, Eco 39, Eco 89 y Eco 136) el gen *mcr-1* se puede encontrar en el mismo plásmido que la betalactamasa, aunque más pruebas serían precisas para confirmarlo.

6.2.6. Estabilidad del genotipo

La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina presentaron una estabilidad igual o superior al 50% (Categoría A). Dado el elevado número de cepas presentes en la categoría A, en la figura 29 se detalla la estabilidad de seis de las cepas, el resto de gráficas se encuentran en los anexos de esta tesis doctoral). Para la clasificación de las mismas se siguieron los criterios establecidos en el apartado 5.2.4 de materiales y métodos. El resto de gráficas de las cepas clasificadas en la categoría A, así como el valor numérico de estabilidad al octavo ciclo de crecimiento sin antibiótico se encuentran en el apartado de anexos.

Por otro lado, tan solo tres cepas (Eco 9, Eco 21 y Eco 60) presentaron una estabilidad del 48, 48.46 y 44.68 %, respectivamente, tras ocho ciclos de crecimiento sin antibiótico (categoría B) (Figura 30).

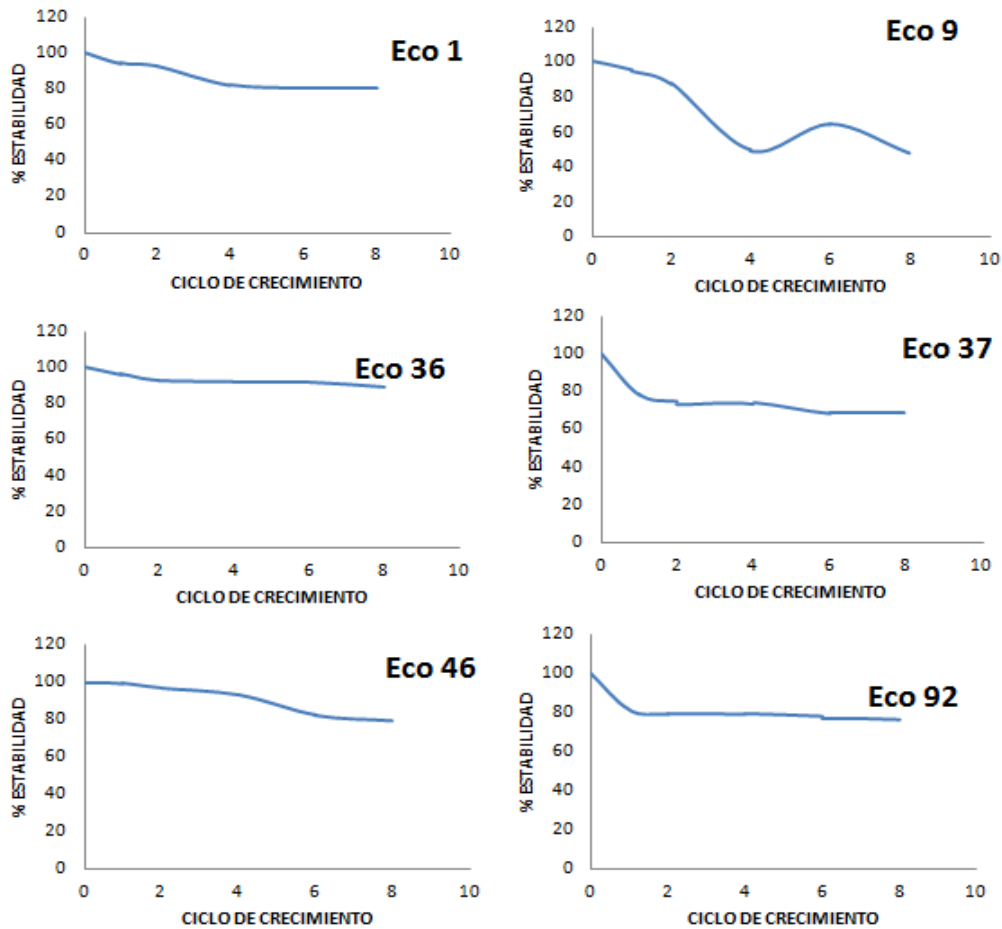


Figura 29: Estabilidad de cepas de *Escherichia coli* presentes en la Categoría A

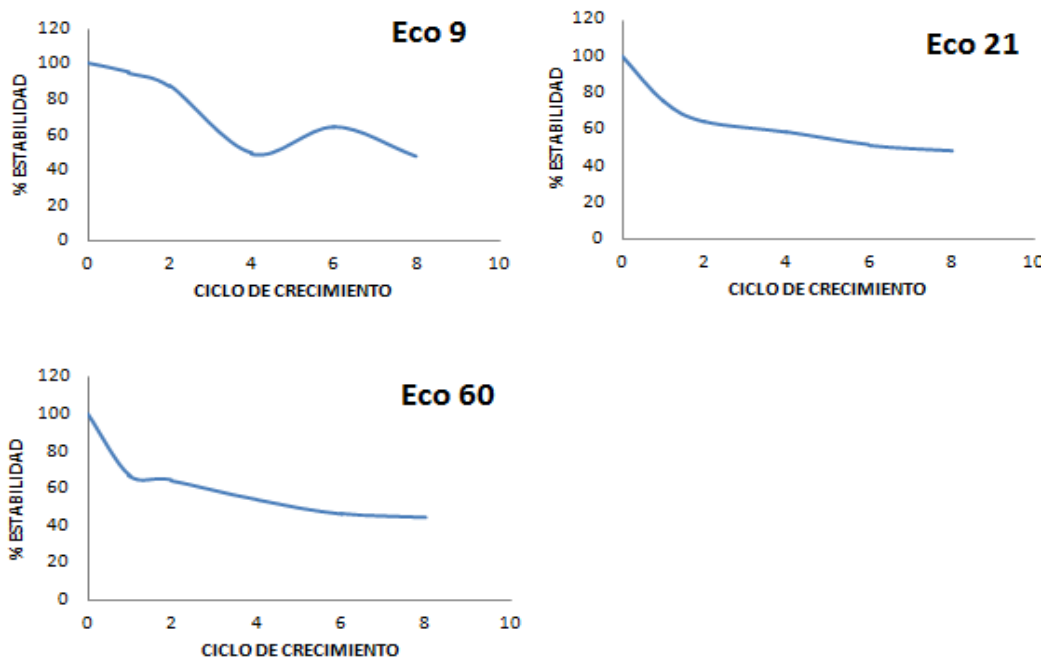


Figura 30: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* presentes en la categoría B.

Ninguna de las cepas de *Escherichia coli*, independientemente del mecanismo de resistencia que presentaran, tuvo una baja o nula estabilidad tras ocho ciclos de crecimiento sin colistina en el medio de cultivo.

CAPÍTULO III

Mecanismos de resistencia a colistina en cepas de *Salmonella enterica* de origen animal

6.3. Mecanismos de resistencia a colistina en cepas de *Salmonella enterica* de origen animal

6.3.1. Cepario

En esta tesis doctoral se han estudiado un total de 28 cepas de *Salmonella* resistentes a colistina de origen animal, aisladas en VISAVET durante el período de 2009 a 2016. Las especies de *Salmonella enterica* aisladas pertenecían a las subespecies enteritidis (67.86 %), typhimurium monofásica (14.29 %), typhimurium (10.71 %) y rissen (7.14 %). En cuanto al origen, observamos que la mayoría de las cepas proceden de cáscara de huevo (60.7 %). Sin embargo también aparecen cepas resistentes en heces de bovino y porcino; ganglios de porcino; carne de ave y porcino; así como en muestras procedentes de Laboratorios Regionales de Salud Pública (LRSP) (Ver Anexo II). Además parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en revistas indexadas (Quesada *et al.*, 2015 y 2016).

6.3.2. Sensibilidad antimicrobiana

Para estudiar la sensibilidad antimicrobiana de los aislados se determinó la CMI de colistina y polimixina B utilizando el método de microdilución en caldo, previamente descrito en el apartado 5.2.2.1 de materiales y métodos. Todas las cepas presentaron una CMI de colistina superior a los 2 mg/L, comprendida entre 4 y 8 mg/L. Para la polimixina B todas las cepas, salvo dos (Sal 20 y Sal 21), presentan una CMI comprendida entre 4 y 8 mg/L. Las cepas Sal 20 y Sal 21 presentaron una CMI de 16 mg/L para la polimixina B (ver anexos). Estos datos indican que todas las cepas son resistentes a ambas polimixinas, al superar el ECOFF establecido por la EUCAST para considerar a una cepa resistente a colistina o polimixina B (2 mg/L). Y que al igual que sucede con las cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina, las cepas de *Salmonella enterica* resistentes a colistina presentan resistencia cruzada a la polimixina B. Por otro lado, al determinar la CMI de colistina mediante E-test se observó que ninguna de las cepas presentan heterorresistencia. Además, la CMI

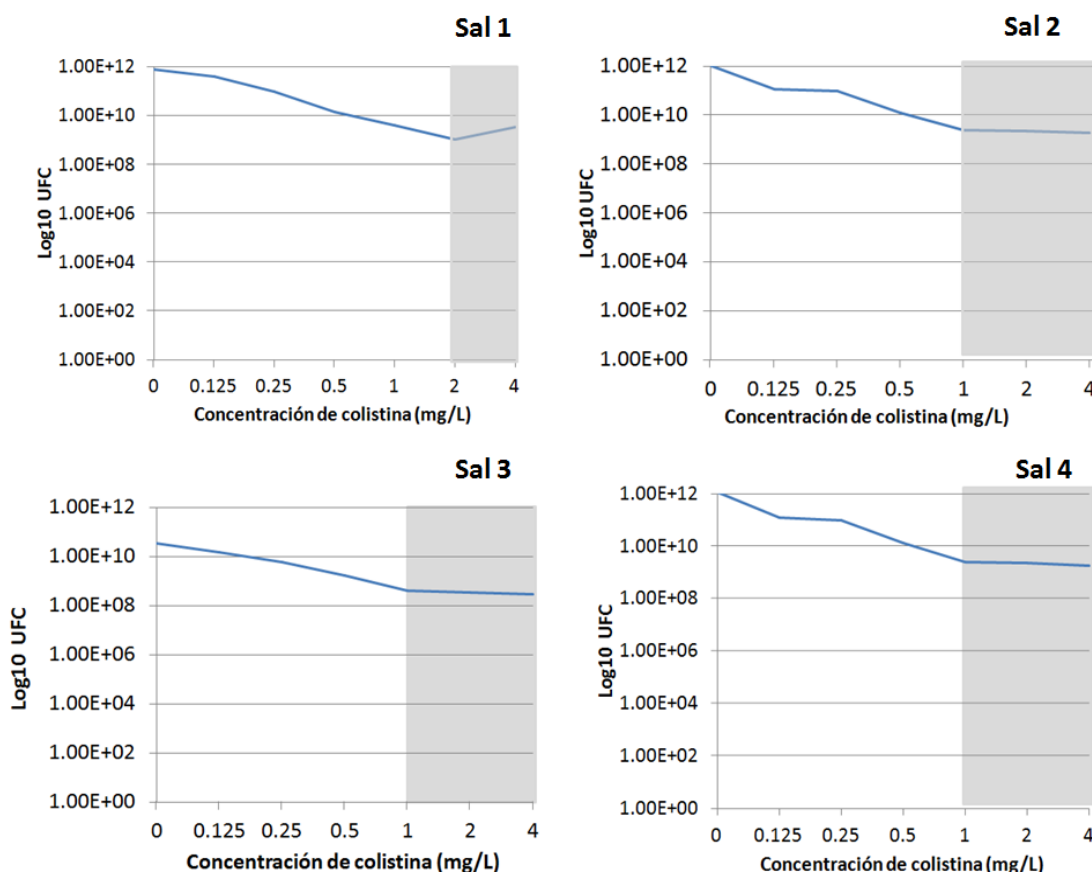
cuantificada con el E-test es, en casi todos los casos, menor que la cuantificada mediante el método de microdilución en caldo (Figura 31).

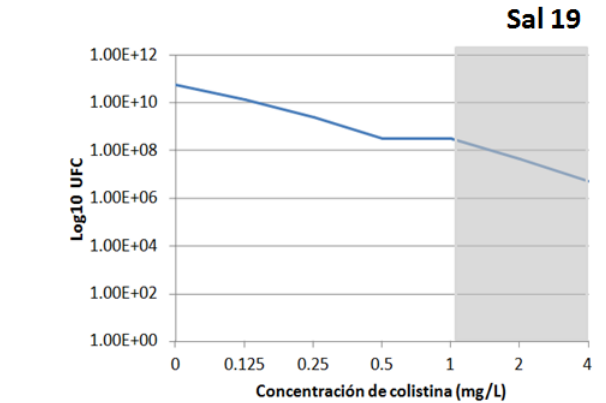
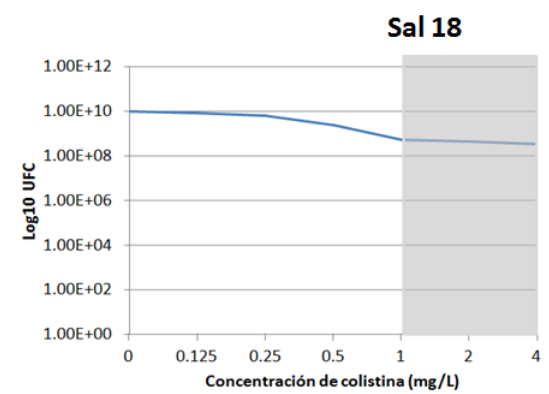
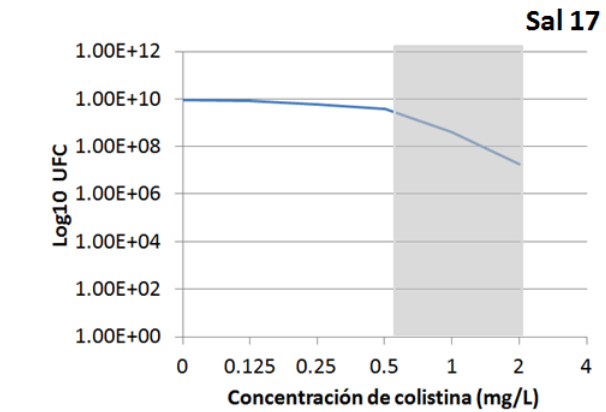
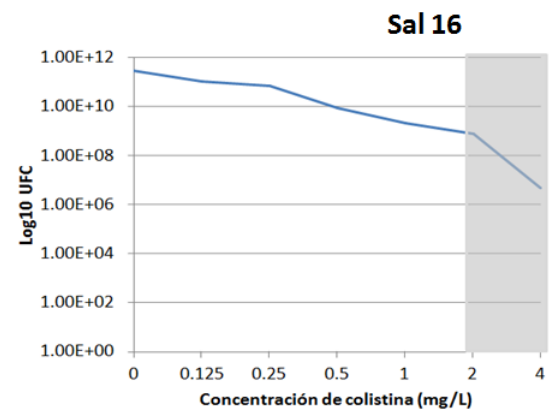
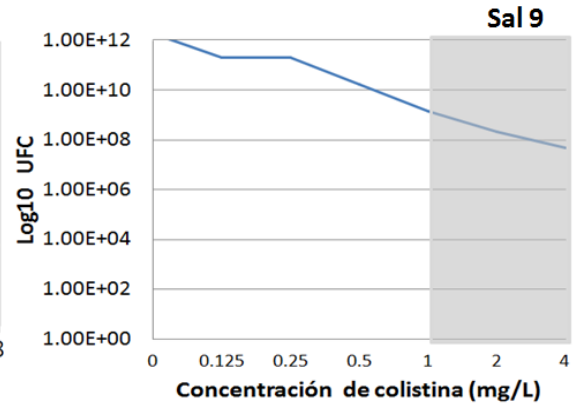
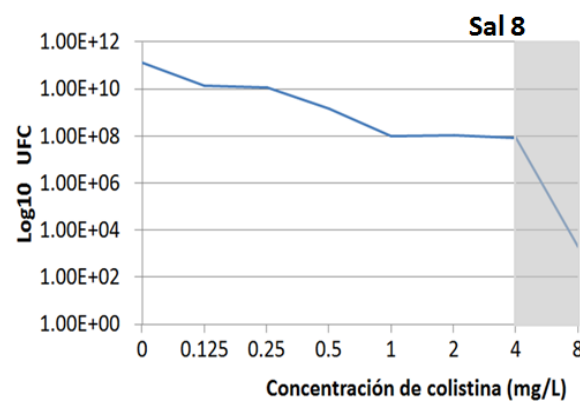
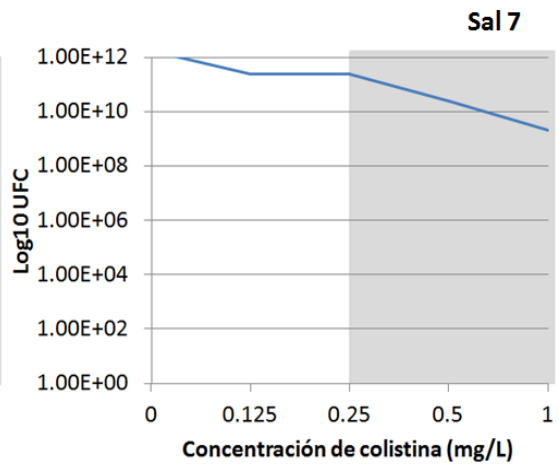
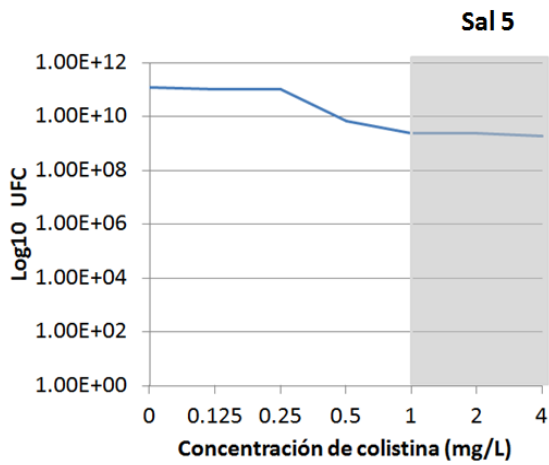


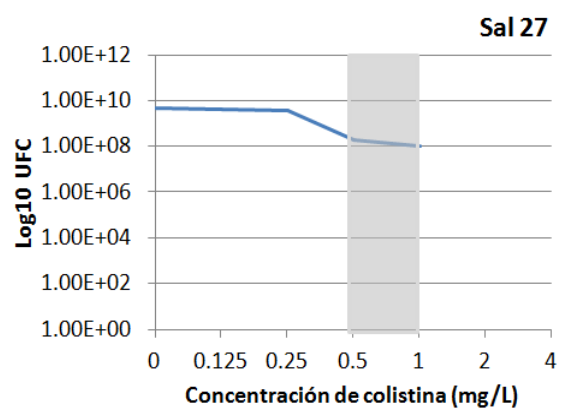
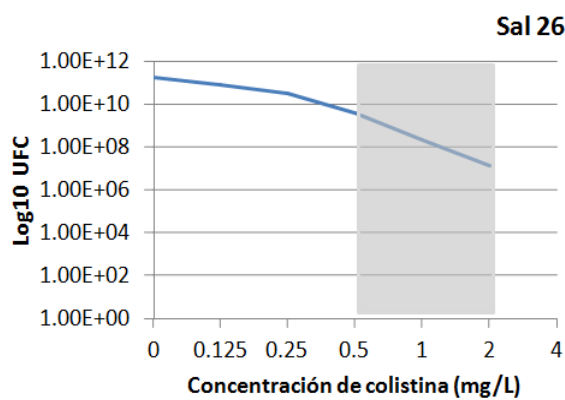
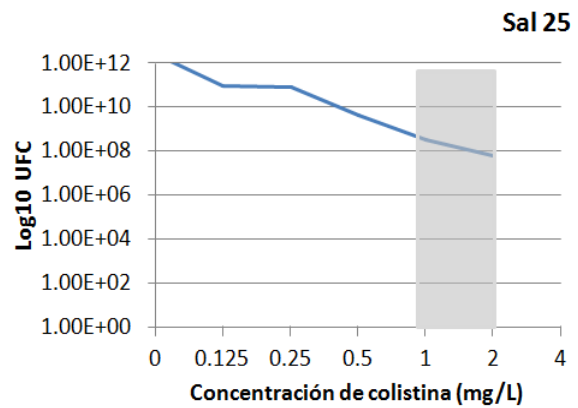
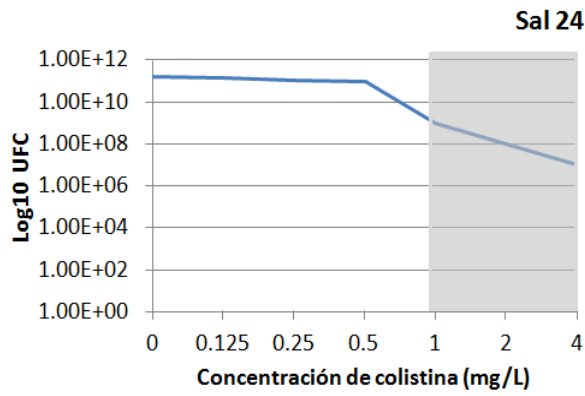
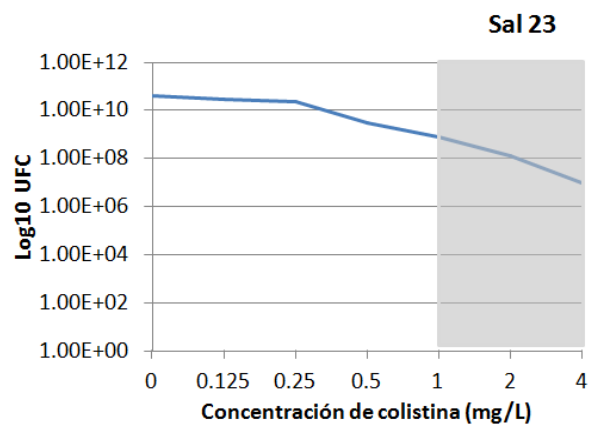
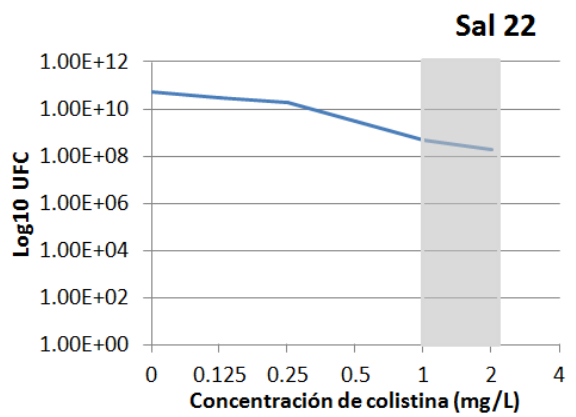
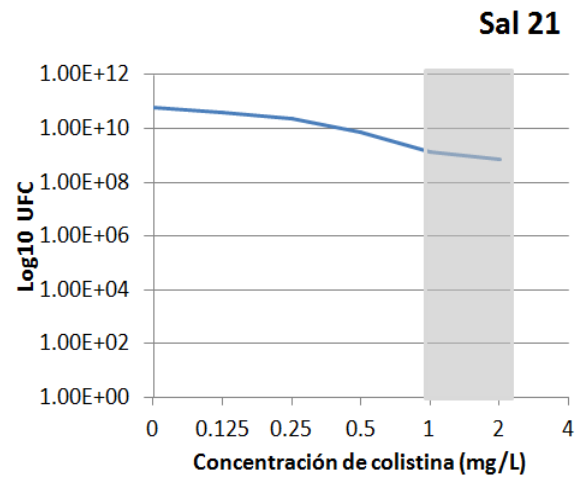
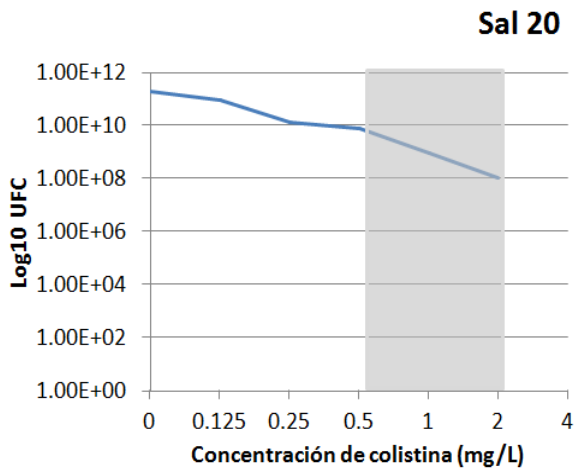
Figura 31: Fotografía de los E-test realizados a las cepas de *Salmonella enterica* que conforman la colección.

En las cepas Sal 28 y Sal 29, fuera de la zona donde se encuentra el E-test, se observan halos circulares sin crecimiento, que puede ser debido a la acción de un fago, aunque serían precisos más estudios para confirmarlo (Figura 31).

Por otro lado, con el objetivo de comprobar la existencia de heterorresistencia a colistina en las cepas de *Salmonella enterica* se realizó la técnica de elección, el PAP, tal y como se describe en el apartado 5.2.2.2. de materiales y métodos. Teniendo en cuenta el criterio propuesto por Halfaway y Valvano en 2015, en el que se establece que hay heterorresistencia cuando se establece una diferencia igual o superior a 8 veces la concentración de antibiótico entre la concentración no inhibitoria más alta y la concentración inhibitoria más baja, se observa que ninguna de las cepas presentes en esta colección presentan heterorresistencia a la colistina (Figura 32).







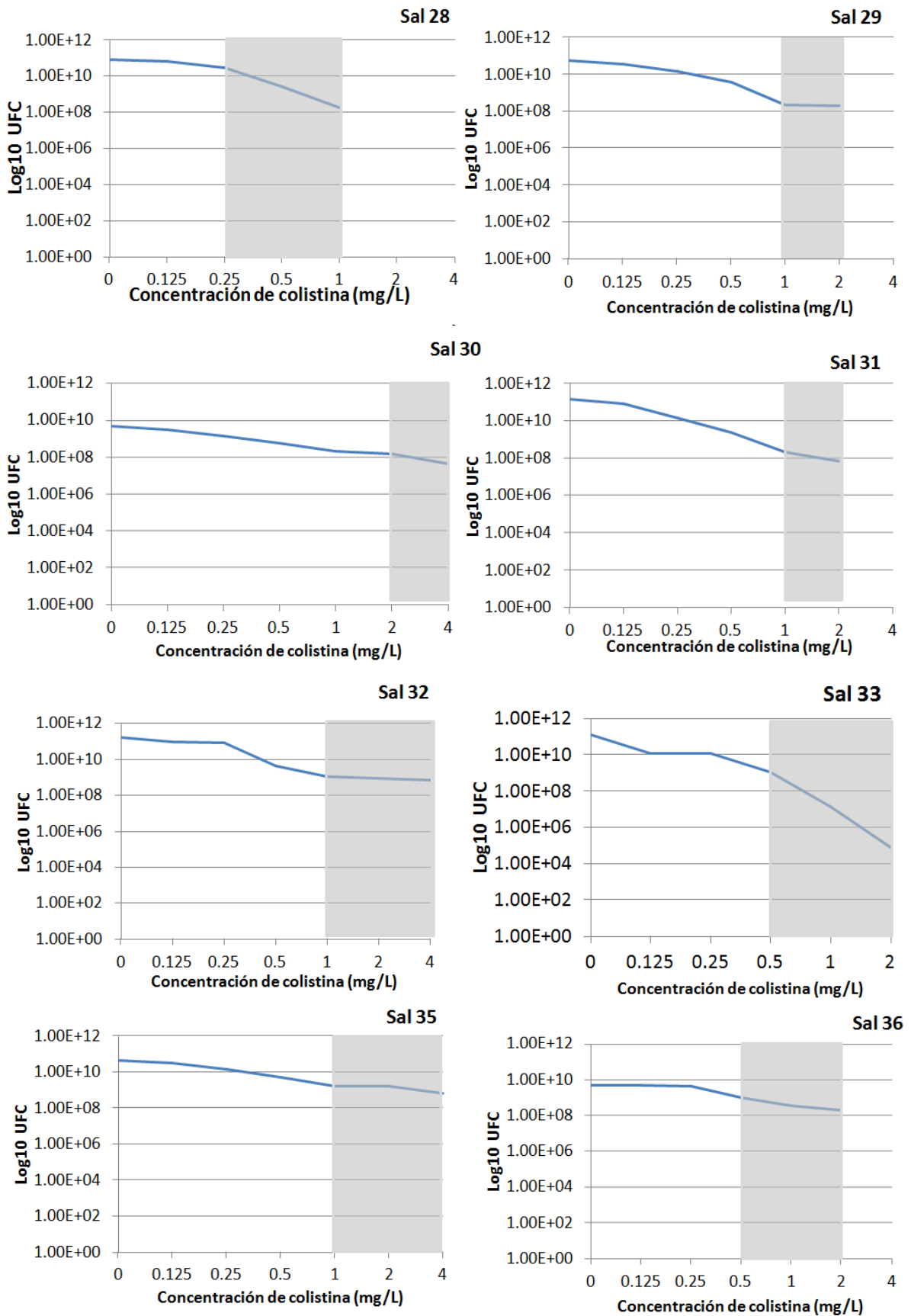
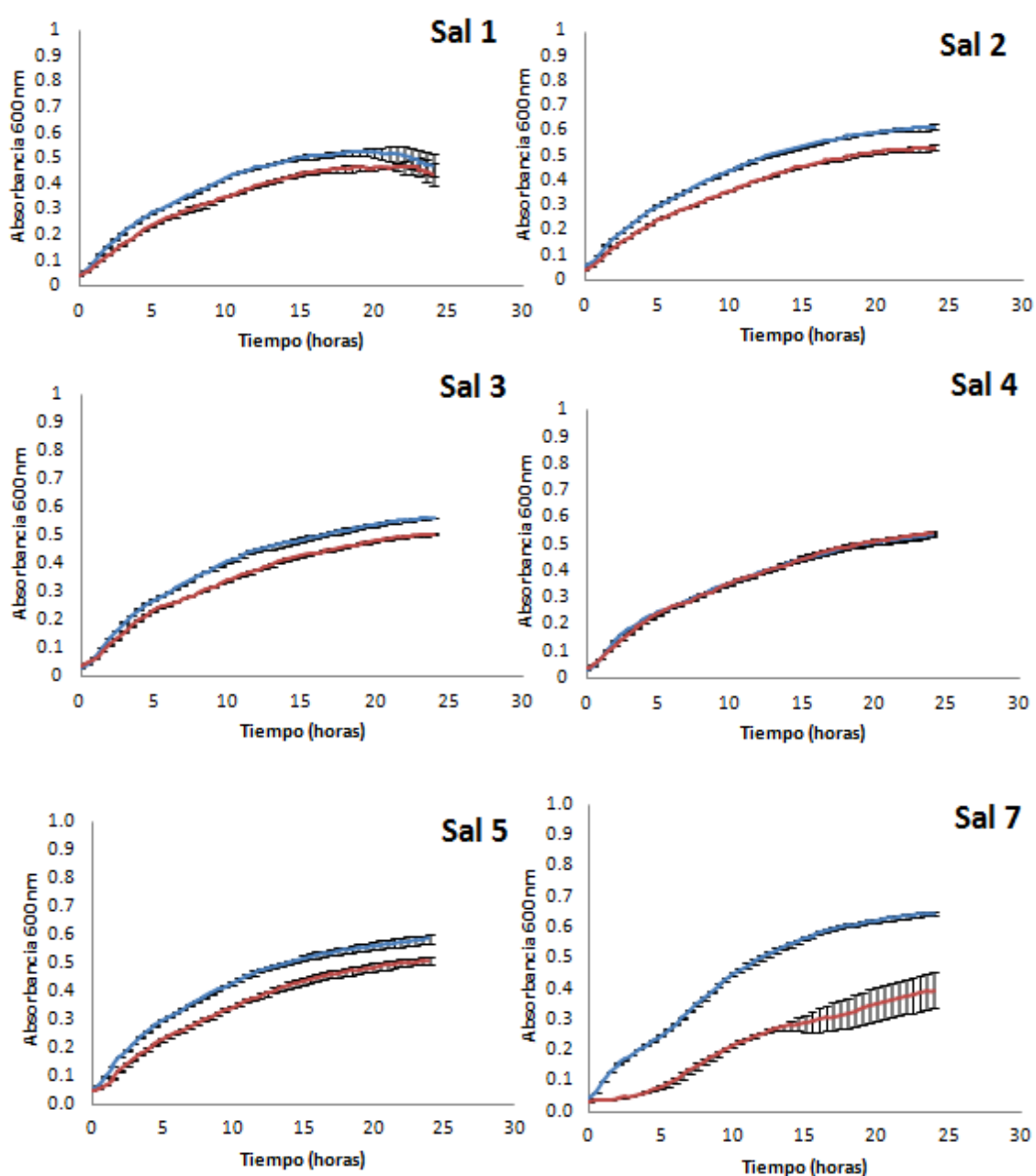
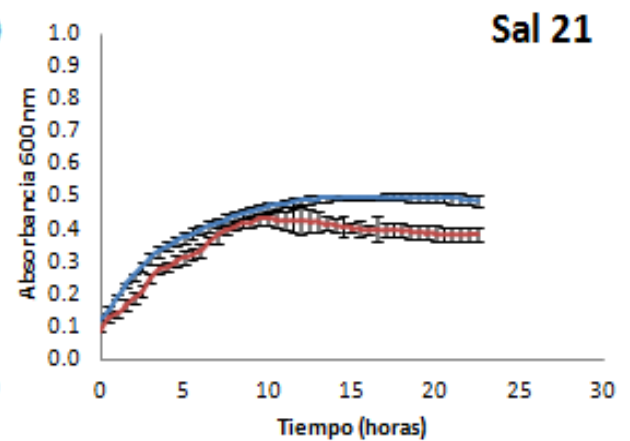
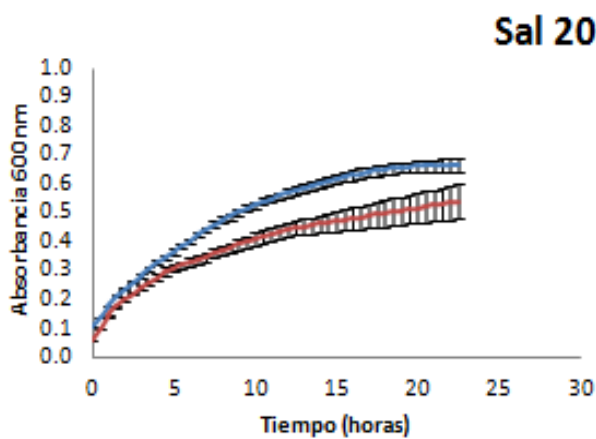
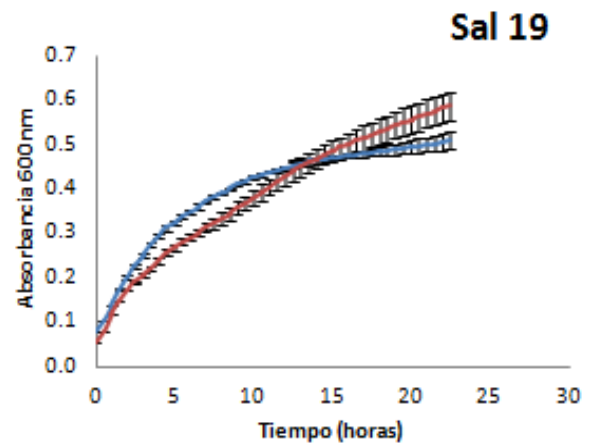
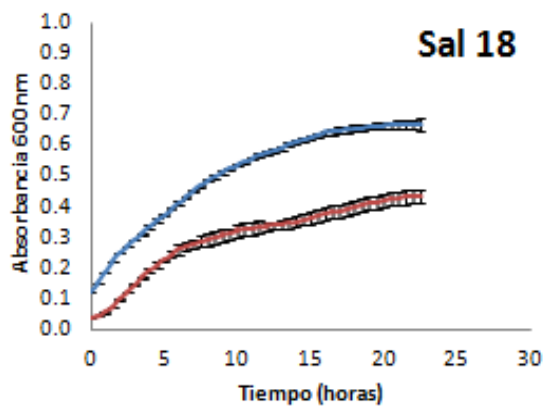
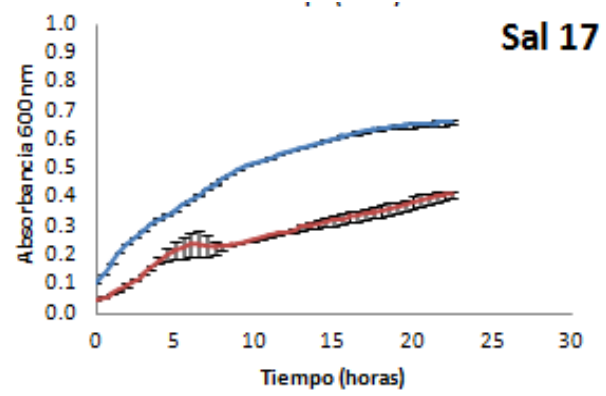
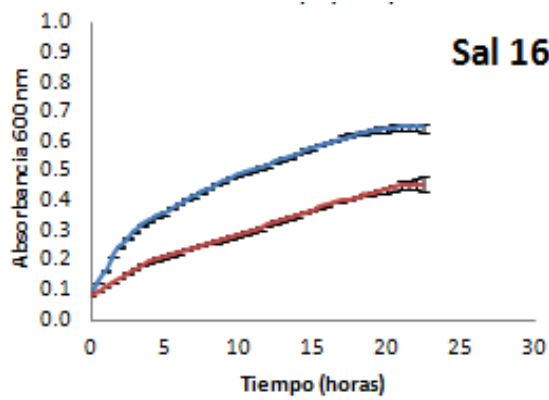
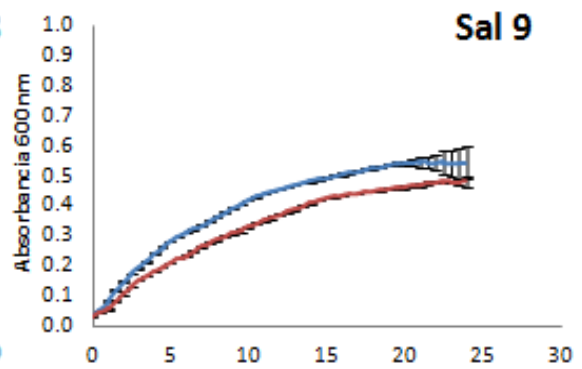
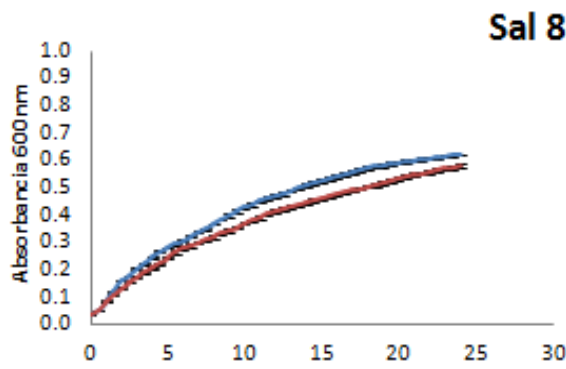


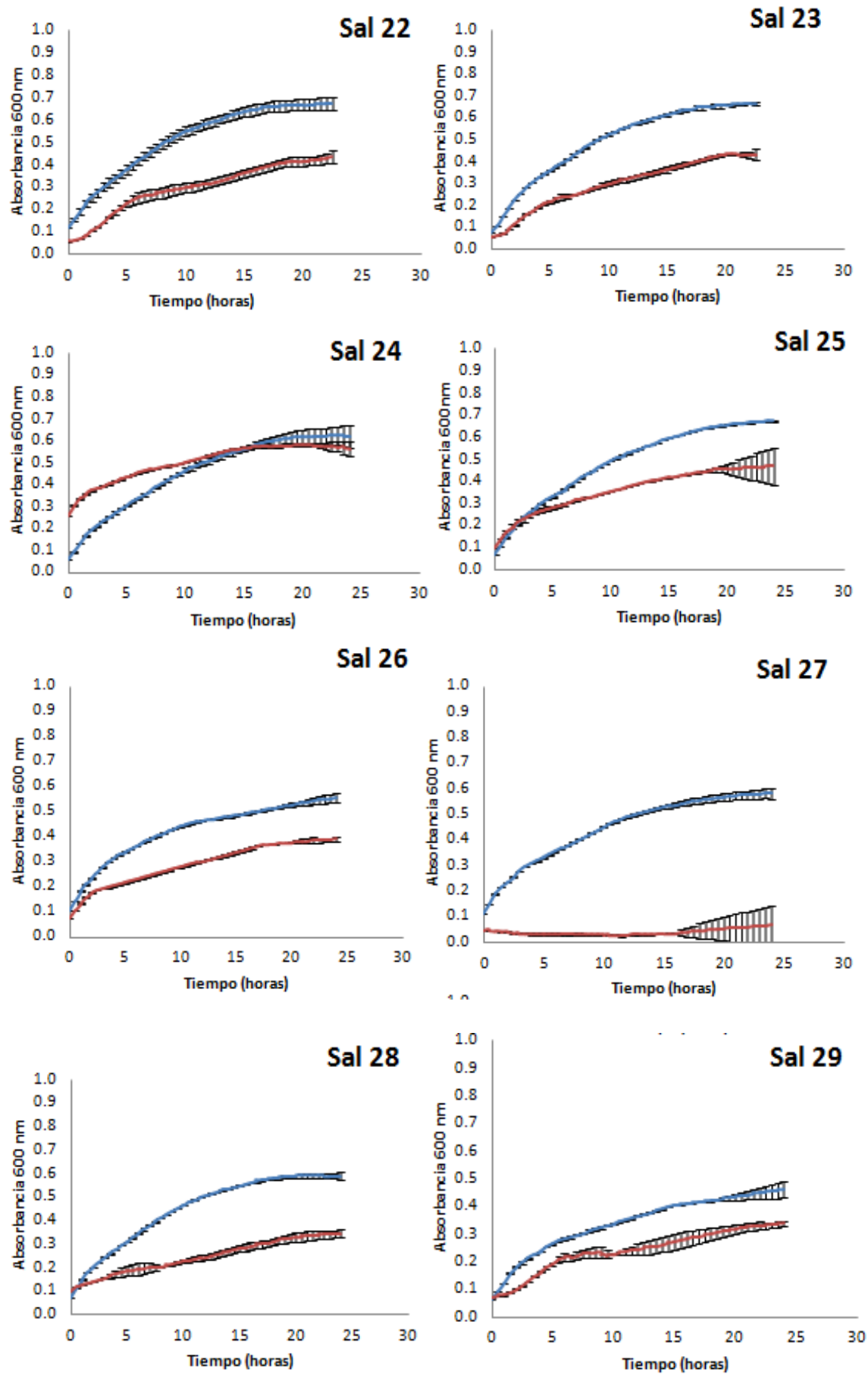
Figura 32: Representación gráfica del PAP de las cepas de *Salmonella enterica* resistentes a colistina. En gris se refleja el rango comprendido entre la concentración no inhibitoria más alta y la concentración inhibitoria más baja

6.3.3. Crecimiento bacteriano

Para la determinación del crecimiento bacteriano de las cepas de *Salmonella enterica* resistentes a colistina se siguió el procedimiento descrito en el apartado 5.2.3.1 de materiales y métodos. Al analizar los datos observamos que las cepas Sal 7, Sal 16, Sal 17, Sal 18, Sal 22, Sal 23, Sal 25, Sal 26, Sal 27, Sal 28, Sal 29, Sal 31 y Sal 36 crecen peor en presencia de colistina en el medio, a una concentración de 2 mg/L, presentando una fase de adaptación mayor. En el resto de cepas el crecimiento es muy similar en presencia o ausencia del antibiótico (Figura 33).







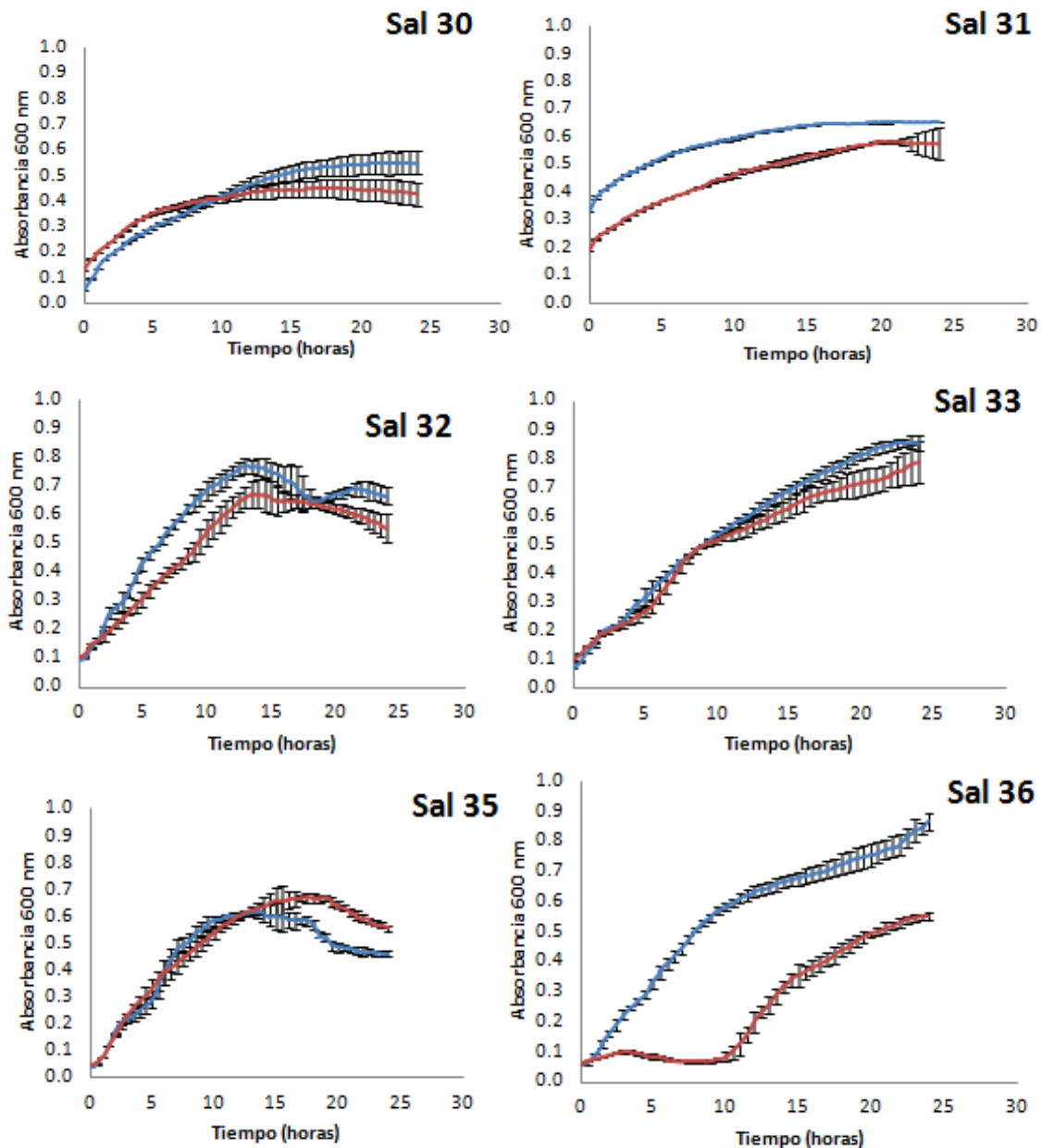


Figura 33: Crecimiento de las cepas de *Salmonella enterica* resistentes a colistina. El crecimiento en medio sin antibiótico se representa con el color azul, mientras que el crecimiento en presencia de colistina, a una concentración de 2mg/L, se representa con el color rojo.

6.3.4. Mecanismos de resistencia a colistina

Al igual que ocurre en las cepas de *Escherichia coli* de origen animal, en el cepario de *Salmonella enterica* encontramos distintos determinantes de resistencia: presencia de polimorfismos en el sistema *pmrAB* o el gen *mcr-1*. Sin embargo, y como observamos en la Anexo II, también encontramos cepas

que no presentan ningún determinante de resistencia previamente descrito en la bibliografía.

6.3.4.1. Polimorfismos en el sistema *pmrAB*

En este cepario encontramos la presencia de polimorfismos en el sistema *pmrAB* en cinco cepas (Sal 16, Sal 20, Sal 24, Sal 28 y Sal 29, de manera aislada. Como observamos en la Anexo II, así como en la figura 34 del apartado 6.3.5 de resultados, todas ellas presentan una estabilidad muy baja situándose en la categoría C (cepas Sal 20, Sal 24 y Sal 29) o en el límite inferior de la categoría B (cepas Sal 16 y Sal 28).

6.3.4.2. Genes *mcr*

A diferencia de lo que ocurre en los aislados clínicos de *Escherichia coli*, en el cepario de *Salmonella* enterica de origen animal solamente encontramos la presencia del gen *mcr-1*, no encontrando ningún otro gen de tipo *mcr* descrito en la bibliografía.

El gen *mcr-1* está presente en siete cepas de la colección (Sal 1, Sal 2, Sal 3, Sal 4, Sal 5, Sal 21 y Sal 30), situado en todos los casos en un plásmido de 60 Kb, aproximadamente, movilizable por conjugación, salvo en la cepa Sal 21.

Cabe destacar que también se realizó el ensayo de conjugación y transformación en aquellas cepas que no presentaron alguno de los genes tipo *mcr*, descritos en ese momento en la bibliografía, para determinar si existía algún elemento más transferible horizontalmente. En ninguna de esas cepas (Sal 7, Sal 8, Sal 9, Sal 16, Sal 17, Sal 18, Sal 19, Sal 20, Sal 22, Sal 23, Sal 24, Sal 25, Sal 26, Sal 27, Sal 28, Sal 29, Sal 31, Sal 32, Sal 33, Sal 34, Sal 35 y/o Sal 36) se observaron conjugantes y/o transformantes que indicaran la presencia de algún elemento móvil nuevo que confiera resistencia a colistina.

En el caso de la cepa Sal 21, no se obtuvieron colonias transformantes resistentes a colistina.

6.3.5. Estabilidad del genotipo

En nuestro cepario se observa la presencia de cepas de *Salmonella enterica* en las tres categorías de estabilidad establecidas en el apartado 5.2.4 de materiales y métodos.

Por un lado, observamos cepas estables (categoría A): Sal 1, Sal 2, Sal 3, Sal 4, Sal 5, Sal 21, Sal 33, Sal 35 y Sal 36 (Figura 35), las cuales, en la mayoría de los casos (salvo las cepas Sal 33, Sal 35 y Sal 36) presentan el gen *mcr-1* (Figura 35, Anexo II). Solo una de las cepas que presentaba el gen *mcr-1* (Sal 30) se situó en la categoría B, de estabilidad intermedia (Figura 36, Anexo II).

Dentro de la categoría B encontramos cepas que en algunas ocasiones no presentaron un mecanismo de resistencia descrito en la bibliografía (cepas Sal 7, Sal 17, Sal 28), salvo las cepas Sal 16 y Sal 24 que presentaban polimorfismos en el sistema *pmrAB*; y la cepa Sal 30 que presenta el gen *mcr-1* (Figura 36, Anexo II).

Finalmente pudimos comprobar que la mayoría de las cepas de *Salmonella enterica* resistentes a colistina de este cepario eran inestables tras 8 ciclos de crecimiento sin antibiótico, perteneciendo así a la categoría C. De las cepas pertenecientes a la categoría C (Sal 8, Sal 9, Sal 18, Sal 19, Sal 20, Sal 22, Sal 23, Sal 24, Sal 25, Sal 26, Sal 27, Sal 29, Sal 31 y Sal 32) observamos que las cepas Sal 20, Sal 24 y Sal 29 presentaban polimorfismos en el sistema *pmrAB*, sin embargo el resto de cepas de esta categoría no presentó ningún determinante de resistencia a colistina descrito en la bibliografía (Figura 37, Anexo II).

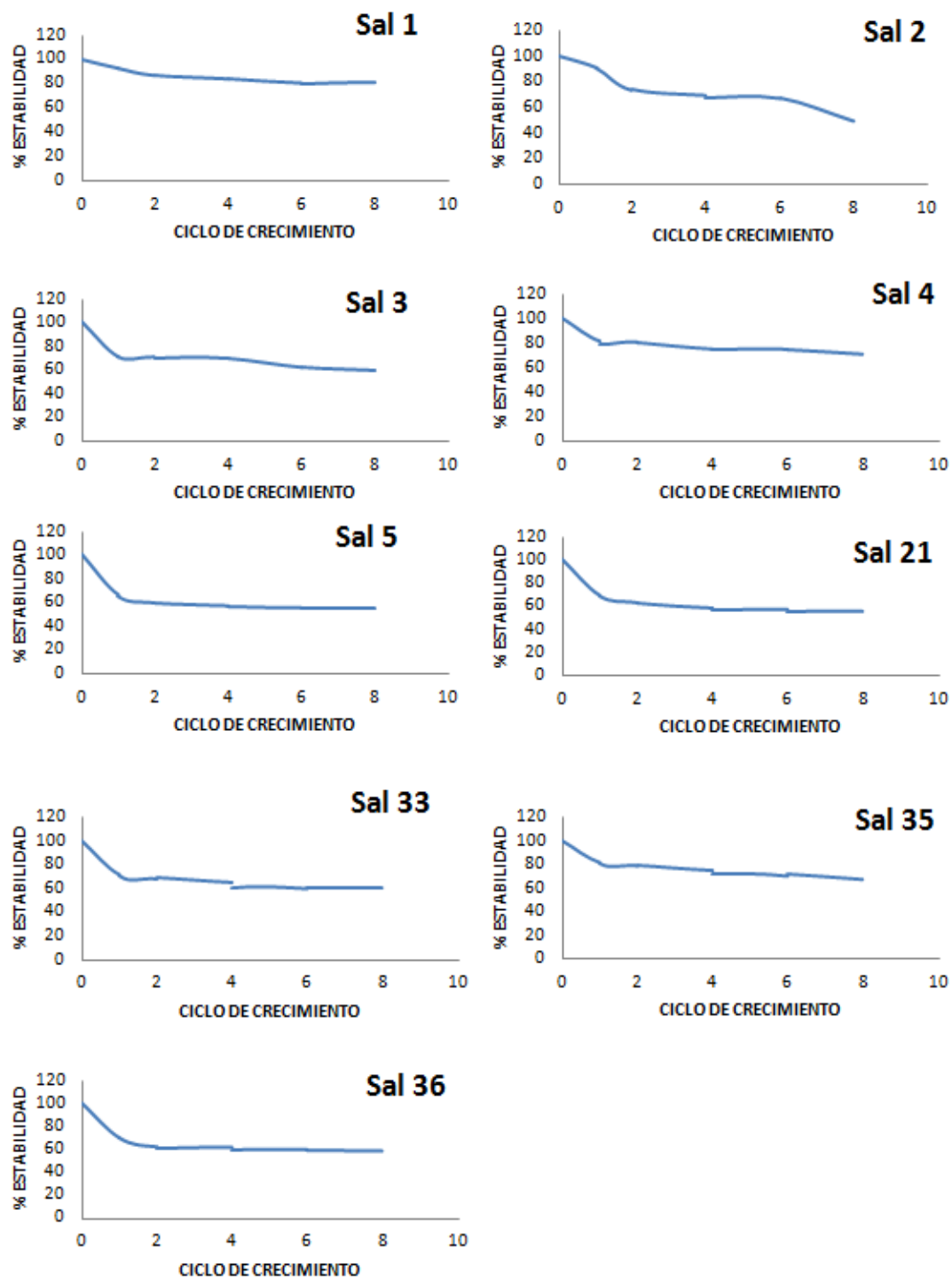


Figura 34: Estabilidad de las cepas de *Salmonella enterica* pertenecientes a la categoría A.

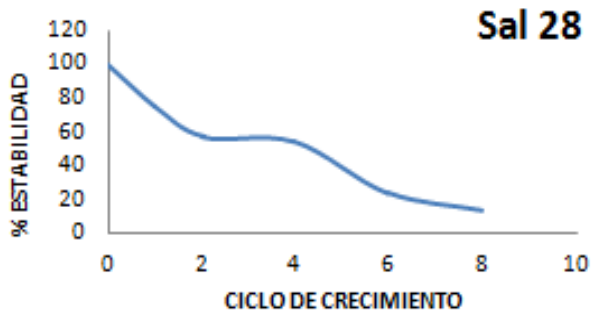
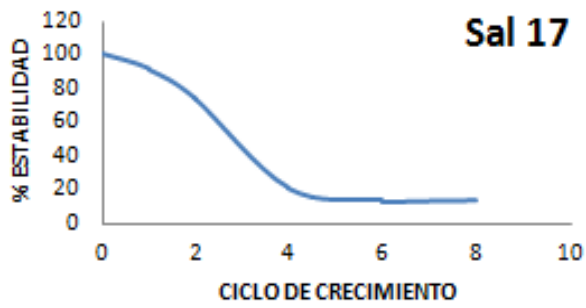
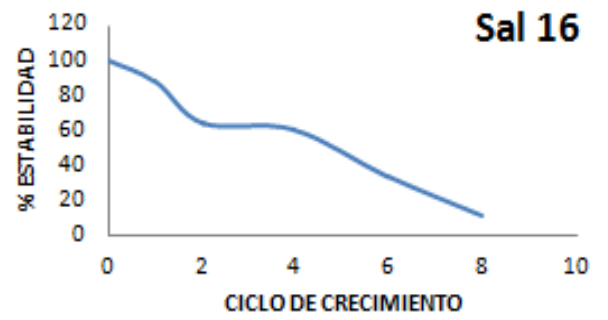
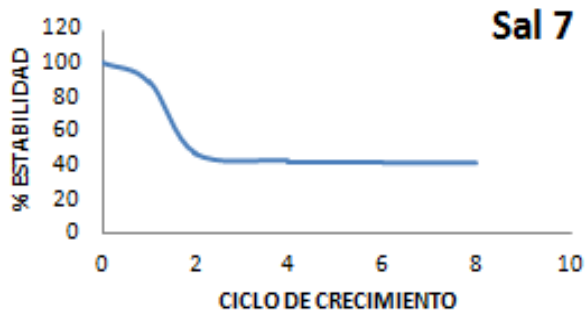
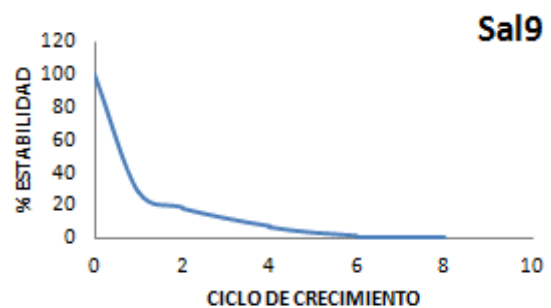
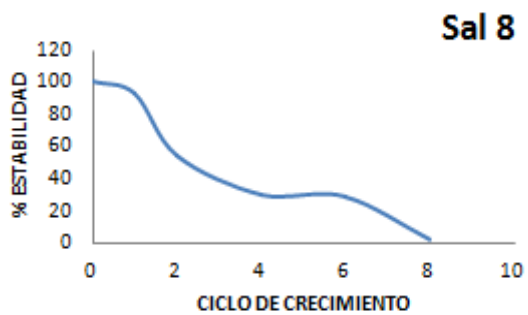
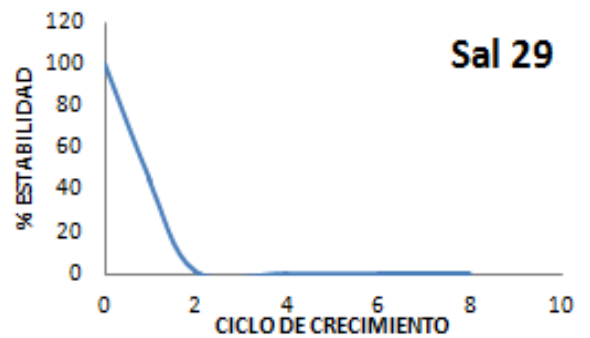
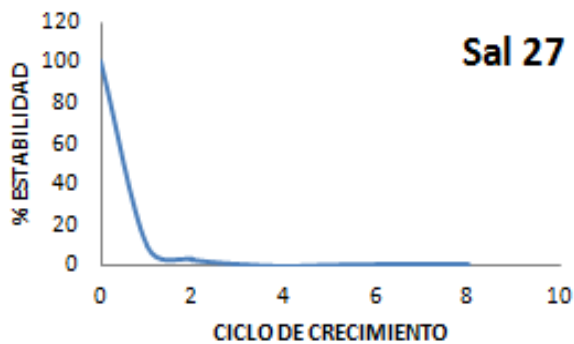
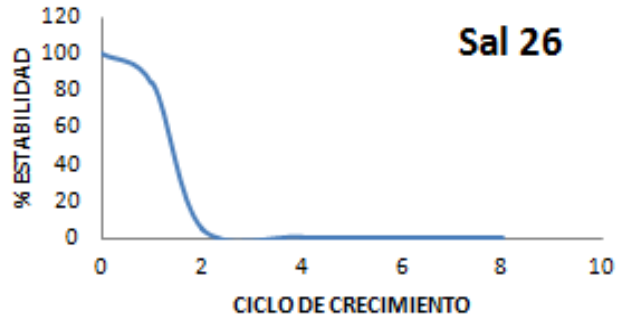
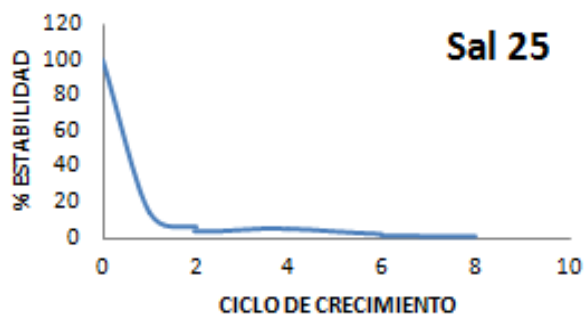
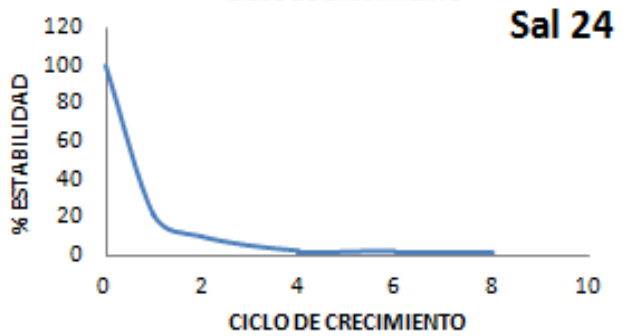
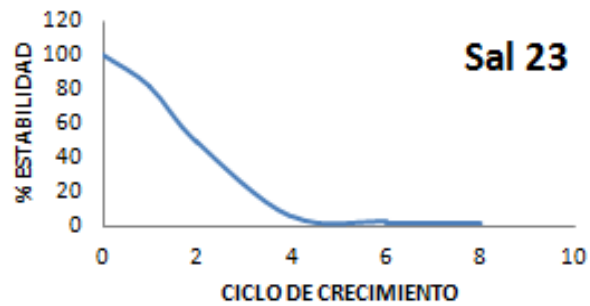
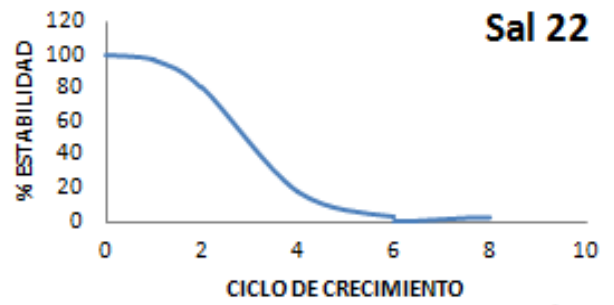
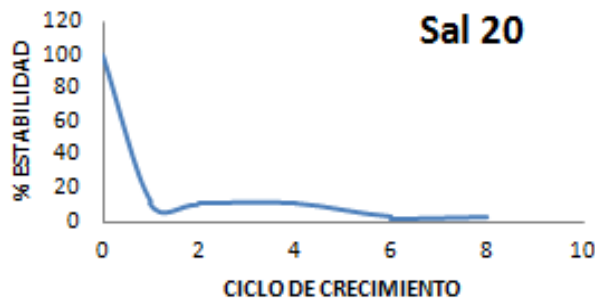
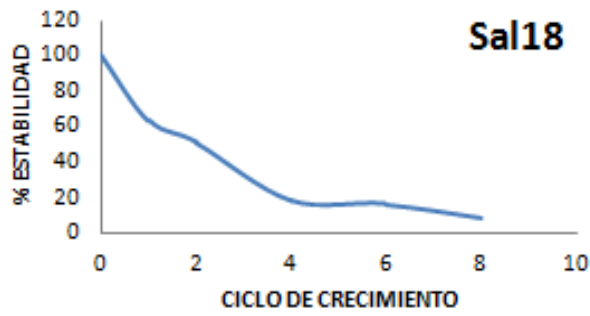


Figura 35: Estabilidad de las cepas de *Salmonella enterica* pertenecientes a la categoría B.





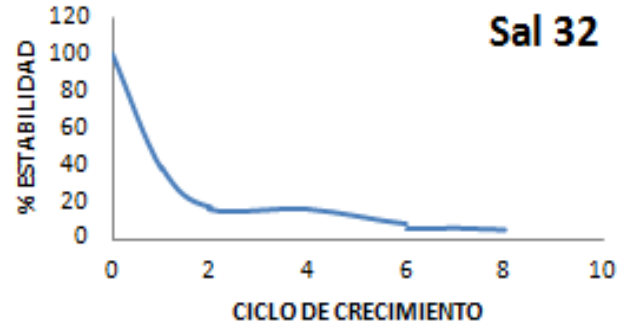
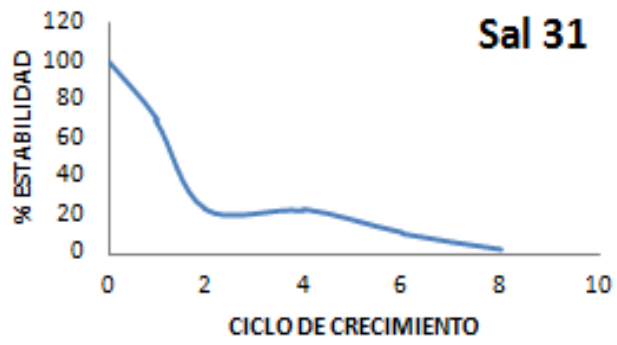


Figura 36: Estabilidad de las cepas de *Salmonella enterica* pertenecientes a la categoría C.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1. Modelo *in vitro* de resistencia a colistina en *Escherichia coli*

Actualmente son pocos los estudios que recrean un modelo *in vitro* con el objetivo de estudiar nuevos mecanismos de resistencia a colistina en enterobacterias. En 2009, Sun y colaboradores, investigaron en un modelo *in vitro* en cepas de *Salmonella enterica* polimorfismos en el sistema *pmrAB* y demostraron la relación entre la existencia de los mismos y la resistencia a colistina. Sin embargo, en *Escherichia coli*, hasta el momento, no existía ningún modelo laboratorial que estudiara nuevos mecanismos cromosómicos de resistencia a colistina. Por ello, en esta tesis doctoral decidimos diseñar un modelo *in vitro* que nos permitiera seleccionar mutantes independientes resistentes a colistina a partir de una cepa sensible a colistina de colección cuyo genoma está perfectamente secuenciado, *Escherichia coli* ATCC 25922, que nos permitiera facilitar el análisis bioinformático.

Para la selección de los mutantes escogimos como “cepa madre” a *Escherichia coli* ATCC 25922 por dos motivos: su genoma estaba completamente secuenciado, lo cual agilizaba la búsqueda de nuevos determinantes de resistencia y, por otro lado, es la cepa de referencia utilizada como control para la determinación de la CMI de colistina utilizando el método de elección establecido por el CLSI y la EUCAST, referenciado en la norma ISO 20776-1.

Como en otros estudios en los que se determina la sensibilidad a colistina en cepas de *Escherichia coli* (Lacour *et al.*, 2006 y 2008; Quesada *et al.*, 2015; Carattoli *et al.*, 2017), en nuestros mutantes se observa una CMI de comprendida entre 2 y 8 mg/L para la colistina y entre 4 y 16 mg/L para la polimixina B. Al realizar el E-test observamos en dos cepas (CR5 y CR6) un fenómeno compatible con heterorresistencia a colistina, sin embargo en el método de microdilución en caldo no se observa ningún “salto de pocillo”, es decir, falta de crecimiento en alguna de las diluciones que confirme este hallazgo. Para confirmar si existe o no heterorresistencia en las cepas CR5 y CR6 sería necesario realizar el análisis del perfil de la población (PAP) así

como el estudio pormenorizado del genoma de estos mutantes. Dicho fenómeno, ligado al hecho de una falta de estabilidad tras ocho ciclos de crecimiento en medio sin colistina parece indicar que el polimorfismo detectado en *pmrB* en estas dos cepas (V161G) es el responsable de tal fenómeno de inestabilidad. Sin embargo, la cepa CR10, con el mismo genotipo que las anteriormente mencionadas (CR5 y CR6) no presenta el fenómeno compatible con heterorresistencia a colistina, aunque sí es inestable tras ocho ciclos sin antibióticos. Probablemente. La existencia de una mutación compensatoria en la cepa CR10 explique la ausencia del fenómeno compatible con el fenómeno de heterorresistencia.

Dado que actualmente no existen investigaciones que relacionen la estabilidad de cepas resistentes a colistina con mecanismos de resistencia de naturaleza cromosómica, y teniendo en cuenta los datos obtenidos el estudio de estabilidad realizado en esta tesis doctoral, la aparición de forma aislada, sin combinar con otros polimorfismos o genes de tipo *mcr*, del polimorfismo V161G en *pmrB*, genera inestabilidad en las cepas que lo portan que hace que se pierda el fenotipo de resistencia de las mismas.

En cuanto a los mecanismos de resistencia presente en los mutantes espontáneos resistentes a colistina encontramos la presencia de una mutación previamente descritas en el sistema *pmrAB*: V161G en *pmrB*, descrita por Sun y colaboradores en 2009 en cepa de *Salmonella enterica*. Teniendo en cuenta los resultados de esta investigación, este trabajo demostramos que esta mutación también confiere resistencia a colistina en cepas de *Escherichia coli*.

Además, en esta tesis doctoral, encontramos dos alelos distintos a los descritos en la bibliografía en cepas de *Salmonella enterica*, uno en *pmrA* (R81S) – en la bibliografía está descrito el alelo R81C en *pmrA* (Sun *et al.*, 2009) - y otro en *pmrB* (L14Q) – en la bibliografía están descritos los alelos L14S y L14F en *pmrB* (Sun *et al.*, 2009), demostrando el grado de resistencia a colistina que desencadenan los mismos (Tabla 12).

Además en este trabajo describimos la presencia de tres polimorfismos nuevos en *pmrB* (Q99P; V133F; y D312N) en *Escherichia coli* y demostramos el grado de resistencia a colistina que desencadenan dichos polimorfismos (Tabla 12).

Por otro lado, tal y como se observa en la figura 25, todos los mutantes espontáneos resistentes a colistina sobre expresaron el gen *pmrH*, debido principalmente a la presencia de polimorfismos en el sistema *pmrAB*. En el mutante CR4, sin polimorfismos en el sistema *pmrAB* o el gen *mgrB*, también observamos sobre expresión del gen *pmrH*, hecho que parece indicar la relación con el TCS PmrA/PmrB.

Al no presentar polimorfismos en el sistema *pmrAB* o en el gen *mgrB*, el genoma del mutante CR4 fue completamente secuenciado utilizando la tecnología Illumina. Al realizar el análisis bioinformático no hallamos algún mecanismo de resistencia previamente descrito en la bibliografía. Sin embargo, en él se detectó un polimorfismo en el gen que codifica la proteína *mccB*, generando un cambio sinónimo e independiente de uso de codones, afectando a una zona palíndroma. La enzima *MccB* cataliza una modificación postraducciona del heptapéptido *MccA* durante la biosíntesis de la microcina C7 (*MccC7*), un antibiótico que actúa como un “caballo de Troya” (Regni *et al.*, 2009). Podría ocurrir que este polimorfismo afectase al grado de expresión de este o algún otro gen de los codificados en el plásmido de 24 Kb (CP009074) presente en la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

Dado que no existen estudios que relacionen esta modificación con la resistencia a colistina, en un futuro procederemos a la amplificación y secuenciación de “la zona problema” para confirmar la presencia y estabilidad de la mutación. Además, será conveniente comprobar si la presencia de esta mutación en el mutante CR4 produce algún cambio significativo en la expresión génica con respecto a su cepa de referencia.

Una vez confirmada la relación entre la presencia de este cambio con la resistencia a colistina procederemos a la búsqueda del mismo en aislados clínicos de origen animal.

7.2. Cepario de origen animal

Tanto las cepas de *Escherichia coli* como las cepas de *Salmonella enterica* de origen animal presentes en este trabajo proceden de especies ganaderas (aves de corral, porcino y bovino) en las que se ha estado utilizando de forma habitual la colistina como tratamiento o profilaxis de infecciones gastrointestinales.

Cabe resaltar la importancia, desde el punto de vista de la Salud Pública, al tratarse por un lado de especies bacterianas zoonóticas y por otro al estar localizadas en animales de abasto, destinados al consumo humano, o productos procedentes de los mismos, sobre todo teniendo en cuenta la gran cantidad de estudios que, claramente, relacionan el abuso o uso inadecuado de antimicrobianos en animales y el incremento de resistencias en bacterias patógenas humanas y animales (Mellon *et al.*, 2001; Neu, 1992).

Aunque en los últimos años la AEMPS ha tomado medidas para reducir el uso de antibióticos, y en especial para reducir el consumo de colistina en la producción ganadera española, y existen algunos resultados en porcino cultura que relacionan la disminución del consumo de colistina con el uso de otros antibióticos, así como con las pérdidas ganaderas, aún no hay datos suficientes que corroboren la efectividad de las medidas higiénico sanitaria que se han aplicado para evitar la diseminación y dispersión de la resistencia a colistina.

Por otro lado, y teniendo en cuenta el alarmante incremento de consumo de colistina en medios hospitalarios humanos, así como la aparición de bacterias resistentes a colistina en humanos (Sánchez-Benito *et al.*, 2017), ratificar la eficacia de estas medidas higiénico sanitarias puede ser clave para contener la resistencia a colistina no sólo en medicina veterinaria sino también en medicina humana.

7.3. Sensibilidad antimicrobiana

En este estudio, para la determinación de la CMI de colistina y polimixina B hemos utilizado el método de referencia indicado por el CLSI y por la EUCAST, descrito en la norma ISO 20776-1, siguiendo las recomendaciones propuestas por estos organismos.

Al analizar los resultados observamos que todas las cepas presentan una CMI superior a 2 mg/L, y nunca superior a los 8 mg/L. Independientemente del mecanismo de resistencia hallado en las cepas, no se observa una relación entre la existencia de un mecanismo concreto y una CMI determinada. En las cepas de *Salmonella enterica* tampoco se observa una relación entre la especie y el grado de resistencia a la colistina.

Por otro lado, en ninguna de las cepas estudiadas observamos la presencia de heterorresistencia o de algún fenómeno compatible con la misma.

7.4. Crecimiento bacteriano

Actualmente, no existen investigaciones que estudien el crecimiento de bacterias resistentes a colistina en medio LB con y sin antibiótico, por este motivo decidimos analizarlo en esta tesis doctoral, aunque fuese complicado discutir los resultados obtenidos, al no disponer de precedentes. El objetivo tras analizar el crecimiento bacteriano de cepas resistentes a colistina es comprobar si los distintos determinantes de resistencia presentes en nuestro cepario están asociados fenotípicamente al crecimiento bacteriano y poder observar si la presencia de antibiótico en el medio disminuye o no el “fitness” (o “vitalidad”) de la bacteria.

Tras analizar los resultados obtenidos en esta tesis doctoral comprobamos que en la mayoría de las bacterias resistentes a colistina, y al igual que sucede en los aislados *in vitro*, no existen cambios significativos entre el crecimiento con 2 mg/L de colistina y el crecimiento sin antibiótico. No mostrándose ninguna relación entre los genotipos caracterizados y el crecimiento bacteriano.

Por otro lado observamos que a partir de las 15 horas de crecimiento en colistina la mayoría de las cepas resistentes inician la fase de muerte celular. Aunque es necesario realizar estudios *in vivo* que confirmen estos datos, es muy importante tener estos datos en cuenta, ya que pueden ser de vital relevancia a la hora de aplicar tratamientos a animales con infecciones gastrointestinales, sobre todo si en ellas están implicadas bacterias resistentes a colistina.

En las cepas de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* que son estables tras ocho ciclos de crecimiento sin antibiótico en el medio, la presencia de antibiótico en el medio apenas influye en el crecimiento bacteriano. Además teniendo en cuenta el crecimiento en medio sin antibiótico de las cepas y comparándolo con el crecimiento de una cepa sensible, *Escherichia coli* ATCC 25922, el “fitness” de las bacterias resistentes a colistina está comprometido.

7.5. Mecanismos de resistencia

Tras analizar 108 cepas resistentes a colistina de origen animal comprobamos que existe gran variedad de mecanismos de resistencia de naturaleza cromosómica así como plasmídica.

Por un lado, en las cepas de *Escherichia coli* el mecanismo de resistencia que predomina es la presencia del gen *mcr-1*, el cual se encuentra localizado principalmente en plásmidos. Al igual que en otras investigaciones (Falgenhauer *et al.*, 2016), en algunas de las cepas de *Escherichia coli* la localización del gen *mcr-1* fue cromosómica (Eco 8, Eco 9, Eco 24, Eco 34, Eco 38, Eco 42, Eco 85 y Eco 138). Sin embargo, en alguna de nuestras cepas (Eco 8 y Eco 9), la localización de este gen no fue siempre cromosómica (Quesada *et al.*, 2016), lo que parece indicar la movilización del gen *mcr-1* del plásmido al cromosoma de dichas bacterias. El hecho de que existan cepas que presenten el gen *mcr-1* en plásmidos no movilizables sugiere que en un futuro estas cepas podrían integrar el gen *mcr-1* en el cromosoma y perder el plásmido.

En aquellos casos en los que el gen *mcr-1* es de naturaleza plasmídica este se encuentra, principalmente, en plásmidos de bajo peso molecular, predominando la presencia del gen *mcr-1* en plásmidos de 33 Kb. Por otro lado, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos (Anexo I), es probable que en algunas ocasiones el gen *mcr-1* sea movilizado conjuntamente en el mismo plásmido con otros determinantes de resistencia a otros antibióticos, como las betalactamasas (Eco 1, Eco 34, Eco 39, Eco 89 y Eco 136), aunque para confirmarlo sería conveniente realizar un campo pulsante e hibridación con sondas específicas para las betalactamasas que portan dichas cepas, así como el análisis genómico que nos permita descifrar la estructura del plásmido. Por el contrario, en todas las cepas de *Salmonella enterica* de nuestra colección la localización del gen *mcr-1* es plasmídica, no hallándose ninguna cepa que lo presente en el cromosoma. Además, en cepas de *Escherichia coli*, también encontramos cepas con otros mecanismos de resistencia de tipo *mcr*, en concreto la presencia del gen *mcr-3* (combinado con el gen *mcr-1*) (Hernández *et al.*, 2017) y *mcr-4* (combinado con *mcr-1* o con polimorfismos en el sistema *pmrAB*). A pesar de lo que sucede en otras investigaciones (Yamaguchi *et al.*, 2018) en los que se transfiere de manera independiente cada gen por conjugación, en nuestra investigación, cuando el gen *mcr-3* aparece en combinación con el gen *mcr-1* este no se transfiere por conjugación o transformación.

Por otro lado, aunque en otras investigaciones se ha descrito la presencia del gen *mcr-4* en *Escherichia coli* en combinación con el gen *mcr-1* (García *et al.*, 2018), esta investigación es la primera que demuestra la transferencia de este gen por conjugación, en una cepa con estas características. Así mismo, en este trabajo se describe por primera vez la existencia de una cepa que combina la presencia del gen *mcr-4* con polimorfismos en el sistema *pmrAB* (Eco 92) y se confirma su funcionalidad mediante transformación a una cepa sensible a la colistina (*Escherichia coli* XL-1 Blue). Respecto al resto de genes *mcr*, que no se han analizado en este trabajo (*mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* y *mcr-8*), el trabajo preliminar realizado por otros integrantes de nuestro grupo de investigación ha permitido obtener borradores de los genomas de todas las cepas analizadas (Hernández y Rodríguez-Lázaro, de las Universidades de Valladolid y Burgos,

respectivamente, mediante comunicación personal) permitiéndonos descartar su presencia haciendo innecesario el uso de la PCR para este fin.

Al analizar el sistema *pmrAB* de nuestro cepario comprobamos la existencia de polimorfismos tanto en los aislados clínicos de *Salmonella enterica* como en los aislados clínicos de *Escherichia coli*. Algunos de los polimorfismos hallados en nuestro cepario han sido descritos previamente, y confirmada su relación con la resistencia a colistina en otras investigaciones, como son los polimorfismos V161G, L23Q, en *pmrB* y R81C, G53R, en *pmrA*, encontrados en cepas de *Salmonella enterica* y descritos por Sun y colaboradores en 2009. Por otro lado, en una de las cepas de *Escherichia coli* (Eco 9) encontramos el polimorfismo R81S, un alelo distinto al descrito por Sun y colaboradores en 2009. Este alelo, también fue hallado en nuestro modelo *in vitro* y demostrada la resistencia a colistina que este confiere introduciéndolo mediante mutagénesis dirigida en un fondo genético salvaje. El hecho de encontrar este polimorfismo en aislados clínicos salvajes refleja la importancia que tiene el diseño de un modelo *in vitro* de mutantes resistentes a colistina en *Escherichia coli* que nos ha permitido ser los primeros en demostrar el papel de este polimorfismo (R81S en *pmrA*). A parte de los polimorfismos previamente detallados encontramos otros, como el que aparece en la cepa Sal 28 (D82Y en *pmrA*), Eco 9 (S39I en *pmrA*) o en la cepa Eco 92 (H2R en *pmrB*). Para asegurar que estas mutaciones confieren resistencia a colistina sería aconsejable realizar en un futuro un experimento de mutagénesis dirigida que confirme o no la relación entre estos polimorfismos y la resistencia a colistina.

Teniendo en cuenta que existen algunas cepas resistentes a colistina de origen animal, tanto de *Salmonella enterica* (Sal 7, Sal 8, Sal 9, Sal 17, Sal 18, Sal 19, Sal 22, Sal 23, Sal 25, Sal 26, Sal 27, Sal 31, Sal 32, Sal 33, Sal 35 y Sal 36) como de *Escherichia coli* (Eco 44, Eco 50, Eco 60 y Eco 64), que no presentan ninguno de los determinantes analizados en este estudio, en un futuro son necesarias más investigaciones que nos ayuden a comprender los mecanismos de resistencia que confieren resistencia a colistina en estas cepas, siendo necesario un estudio exhaustivo del genoma así como la búsqueda de los determinantes encontrados en el mutante CR4.

7.6. Estabilidad del genotipo

Los resultados del estudio de estabilidad de esta tesis doctoral, además de ser pioneros a nivel mundial, ya que no existen investigaciones que estudien la estabilidad de cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* resistentes a colistina en ausencia de antibiótico en el medio, nos ofrecen una visión, desde el punto de vista de la Salud Pública, muy importante ya que podrían contribuir a modificar protocolos de actuación sanitaria así como implementar nuevas medidas que ayuden a combatir la resistencia a colistina.

En este estudio observamos que la presencia de genes de tipo *mcr*, independientemente de la especie que lo albergue o de si aparece en combinación con otros determinantes de resistencia, confiere estabilidad a la bacteria permitiéndole mantener el genotipo de resistencia a colistina. Por otro lado, en el caso de las cepas de *Escherichia coli*, los polimorfismos en el sistema *pmrAB* presentes son bastante estables tras ocho ciclos de crecimiento sin antibiótico, sin embargo, no sucede lo mismo con las cepas de *Salmonella enterica*, las cuales presentan una estabilidad muy baja o son inestables, tras ocho ciclos de crecimiento sin antibiótico en el medio, siempre que albergan polimorfismos en el sistema *pmrAB*. Al igual que en los mutantes resistentes a colistina aislados *in vitro* la presencia del polimorfismo V161G en *pmrB* en cepas de *Salmonella enterica*, que no presentan en combinación otro mecanismo de tipo *mcr*, produce una pérdida de estabilidad en las cepas que lo portan cuando crecen en ausencia del antibiótico. Este dato es de especial importancia, ya que parece indicar que la eliminación de la colistina del medio contribuye a la eliminación de este genotipo (V161G en *pmrB*).

El hecho de que las cepas sean estables en ausencia de antibiótico hace que podamos trabajar con ellas en el laboratorio, permitiéndonos estudiar el genotipo de las mismas sin preocuparnos de que se produzcan fenómenos de variabilidad genética o pérdida del mismo. Sin embargo, este hecho supone un gran problema desde el punto de la Salud Pública, ya que nos informa de la persistencia de estos genotipos, lo que puede facilitar su dispersión.

Desde el punto de vista de la Salud Pública, y teniendo en cuenta que la mayoría de los productos autorizados y comercializados en España, que contienen colistina, presentan un tiempo de espera de cero o un día en las especies de consumo o en sus productos derivados (Anexo V), los datos de esta investigación sugieren que esta medida preventiva debe ser revisada y modificada para garantizar la Salud Pública, ya que estas especies son zoonóticas y pueden favorecer la transmisión de estas resistencia mediante la ingesta de alimentos procedentes de las especies ganaderas que portan cepas resistentes a colistina.

Finalmente, como resumen cabe destacar, que aunque son necesarias investigaciones futuras que nos permitan descubrir todos los determinantes que confieren resistencia a colistina, así como confirmar la relación entre los nuevos determinantes hallados en el mutante CR4 y la resistencia a este antibiótico, esta investigación es pionera en varios aspectos, ya que por un lado ha establecido por primera vez en el mundo la relación entre los polimorfismos: R81S en *pmrA*, L14Q, Q99P, V133F y D312N en *pmrB*, y la resistencia a colistina. Además, en esta tesis doctoral se ha descrito por primera vez en Europa la coexistencia de los genes *mcr-1* y *mcr-3* en una cepa de *Escherichia coli* de bovino. Y por último, pero no por ello menos importante, en este estudio analizamos por primera vez el crecimiento bacteriano y la estabilidad de los genotipos de cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* resistentes a colistina obteniendo resultados claramente aplicables desde el punto de vista terapéutico, profiláctico, así como de gestión en el ámbito de la Salud Pública y Animal.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- Las mutaciones espontáneas R81S en PmrA y L14Q, Q99 y V133F en PmrB, que afectan la estructura del sistema de doble componente PmrA/PmrB y que confieren resistencia a la colistina en *Escherichia coli*, analizadas en este trabajo por primera vez, producen fenotipos relativamente estables, mientras que el polimorfismo V161G en PmrB confiere inestabilidad fenotípica.
- En las cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina de origen animal, la presencia de genes *mcr* es el principal determinante de resistencia, siendo *mcr-1* el más frecuente y estando asociado a una elevada estabilidad y potencial de dispersión, encontrándose también el gen *mcr-3*, descrito en este trabajo por primera vez en el sur de Europa.
- En las cepas de *Salmonella enterica* resistentes a colistina de origen animal, la presencia de genes *mcr* es un determinante de resistencia minoritario, siendo más frecuente la existencia de mutaciones en el sistema PmrA/PmrB y otro(s) determinante(s) desconocido(s) asociados a baja estabilidad y escaso potencial de dispersión.
- La elevada estabilidad y potencial de dispersión de fenotipos de resistencia a la colistina en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* hace aconsejable revisar los tiempos de espera de los medicamentos que contienen colistina en especies destinadas a consumo humano.
- Además de las mutaciones en PmrA/PmrB y la presencia de genes de tipo *mcr*, en *Escherichia coli* existe al menos un nuevo determinante de resistencia de naturaleza desconocida que confiere resistencia a colistina a través de la misma ruta de señalización para la decoración del LPS mediante la adición de L-4AraN.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham EP, Chain E** (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 10:677-678.
- AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, Randall LP, Lemma F, Crook DW, Teale C, Smith RP, Anjum MF**(2017). *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother* 72:2745–2749.
- Agerso Y, Torpdahl M, Zachariassen C, Seyfarth A, Hammerum AM, Nielsen EM** (2012). Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog Dis* 9: 367–369.
- Aguirre A, Lejona S, Vescovi EG, Soncini FC** (2000). Phosphorylated PmrA interacts with the promoter region of *ugd* in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* 182: 3874–3876.
- Ainsworth GC, Brown AM, Brownlee G** (1947). Aerosporin, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus*. *GREER. Nature*. 160: 263.
- Anaya-López JL, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A** (2013). Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Crit Rev Microbiol* 39: 180–95.
- Aquilini E, Merino S, Knirel YA, Regue M, Tomas JM** (2014). Functional identification of *Proteus mirabilis eptC* gene encoding a core lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferase. *Int J Mol Sci* 15: 6689-6702.
- Atabek A, Camesano TA** (2007). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Lipopolysaccharides and Extracellular Polymers on Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 189: 8503–8509.
- Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y, Kono T** (2004). The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol*. 12: 394–398
- Bébéar CM, Pereyre S** (2005). Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 5: 263-271.
- Benedict RG, Langlykke** (1947). The antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. *J Bacteriol*. 54: 24.
- Beveridge TJ** (1999). Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived membrane vesicles. *J Bacteriology*. 181: 4725-4733
- Bilecen K, Fong JCN, Cheng A, Jones CJ, Zamorano-Sánchez D, Yildiz FH** (2015). Polymyxin B Resistance and Biofilm Formation in *Vibrio cholerae* Are Controlled by the Response Regulator CarR. *Infect and Immunity*. 83: 1199–1209
- Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B** (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase

gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother.* 72:3317-3324.

Boyen F, Vangroenweghe F, Butaye P, De Graef E, Castryck F, Heylen P, Vanrobaeys M, Haesebrouck F (2010). Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Vet Microbiol* 144:359–362.

Brink AJ, Richards GA, Colombo G, Bortolotti F, Colombo P, Jehl F (2014). Multicomponent antibiotic substances produced by fermentation: implications for regulatory authorities, critically ill patients and generics. *Int J Antimicrob Agents* 43: 1-6.

Broeker NK, Barbirz S (2017). Not a barrier but a key: How bacteriophages exploit host's O-antigen as an essential receptor to initiate infection. *Mol Microbiol.* 105:353-357.

Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrali CF (2016). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22(31).

Carretto E, Brovarone F, Nardini P, Russello G, Barbarini D, Pongolini S, Gagliotti C, Carattoli A, Sarti M (2018). Detection of *mcr-4* positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. *Euro Surveill.* 23:2

Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Navas AL, Mackay D, Magiorakos AP, Romo MA, Moulin G, Madero CM, Pomba MC, Powell M, Pyorala S, Rantala M, Ruzauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Torneke K, van Duijkeren E, Edo JT. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrobial Agents* 46: 297-306.

Chen L, Zhang J, Wang J, Butaye P, Kelly P, Li M, Yang F, Gong J, Yassin AK, Guo W, Li J, Song C, Wang C (2018). Newly identified colistin resistance genes, *mcr-4* and *mcr-5*, from upper and lower alimentary tract of pigs and poultry in China. *PLoS One.* 14;13(3):e0193957.

Chiu VSW, Hoepflich PD (1961). Susceptibility of *Proteus* and *Providencia* bacilli to ten antibacterial agents. *Amer. J. Med. Sci.* 241:309-321.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed. Document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- Conde-Álvarez R, Palacios-Chaves L, Gil-Ramírez Y, Salvador-Bescós M, Bárcena-Varela M, Aragón-Aranda B, Martínez-Gómez E, Zúñiga-Ripa A, de Miguel MJ, Bartholomew TL, Hanniffy S, Grilló MJ, Vences-Guzmán MÁ, Bengoechea JA, Arce-Gorvel V, Gorvel JP, Moriyón I, Iriarte M** (2018). Identification of *lptA*, *lpxE*, and *lpxO*, Three Genes Involved in the Remodeling of *Brucella* Cell Envelope. *Front Microbiol.* 18: 2657.
- Coornaert A, Lu A, Mandin P, Springer M, Gottesman S, Guillier M** (2010). MicA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress. *Mol. Microbiol.* 76, 467–479
- Costerton J.W., Ingram J.M., Cheng K.J. (1974). Structure and Function of the Cell envelope of Gram-Negative Bacteria. *Bact Reviews.* 38: 87-110.
- Courtieu AL, Monnier JJ, de Loyndre P, Guillermet FN** (1961). Spectre antibacterien de la colistine vis-a-vis de 1200 souches. *Ann Inst Pasteur* 4:14-31.
- Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, Li J, Velkow T** (2013). A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)* 67:147-151
- Dixon RA, Chopra I** (1986). Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother* 29:781-788.
- Eichhorn I, Feudi C, Wang Y, Kaspar H, Feßler AT, Lübke-Becker A, Michael GB, Shen J, Schwarz S** (2018). Identification of novel variants of the colistin resistance gene *mcr-3* in *Aeromonas* spp. from the national resistance monitoring programme GERM-Vet and from diagnostic submissions. *J Antimicrob Chemother* 73:1217-1221.
- Fage CD, Brown DB, Boll JM, Keatinge-Clay AT, Trent MS** (2014). Crystallographic study of the phosphoethanolamine transferase EptC required for polymyxin resistance and motility in *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70:2730-9.
- Falagas ME, Kasiakou SK** (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 40:1333-1341.
- Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK** (2010). Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat* 13: 132-138.
- Falgenhauer L, Waersada S-E, Gwozdzinski K, Ghosh H, Doijad S, Bunk B, Sproeer C, Imirzalioglu C, Seifert H, Irrgang A, Fischer J, Guerra B, Kaesbohrer A, Overmann J, Goesmann A, Chakraborty T** (2016). Chromosomal locations of *mcr-1* and *bla* (CTX-M-15) in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* ST410. *Emer Infect Disease* 22:1689–1691.
- Gallardo-Godoy A, Muldoon C, Becker B, Elliott AG, Lash LH, Huang JX, Butler MS, Pelington R, Kavanagh AM, Ramu S, Phetsang W, Blaskovich MA, Cooper MA** (2016). Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B. *J Med Chem* 59: 1068-1077.
- Garcia-Graells C, Sigrid CJ, De Keersmaecker, Vanneste K, Pochet B, Vermeersch K, Roosens N, Dierick K, Botteldoorn N** (2017). Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance, *mcr-1* and *mcr-2* Genes, in *Salmonella*

spp. Isolated from Food at Retail in Belgium from 2012 to 2015. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* Volume XX, Number XX, 2017^a Mary Ann Liebert,

García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Díaz-Jiménez D, Blanco JE, Alonso MP, Blanco J (2018). Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *Int J Antimicrob Agents*.

Guckes KR, Kostakioti M, Breland EJ, Gu AP, Shaffer CL, Martinez CR 3rd, Hultgren SJ, Hadjifrangiskou M (2013). Strong cross-system interactions drive the activation of the QseB response regulator in the absence of its cognate sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. t 8;110(41):16592-7.

Hancock RE, Chapple DS (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1317- 23.

Hernández M, Iglesias MR, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Quijada N, Miguela-Villoldo P, Campos MJ, Píriz S, López-Orozco G, de Frutos C, Sáez JL, Ugarte-Ruiz M, Domínguez L, Quesada A (2017). Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. *Euro Surveill*. 2017 Aug 3;22(31).

Herrera CM, Henderson JC, Crofts AA, Trent MS (2017). Novel Coordination of Lipopolysaccharide Modifications in *Vibrio cholerae* promotes CAMP resistance. *Mol Microbiology*.

Isshiki Y, Kawahara K, Zahringer U (1998) Isolation and characterisation of disodium (4-amino-4-deoxy-beta-L- arabinopyranosyl)-(1-->8)-(Dglycero-alpha-D-talo-oct-2-ulopyranosylona te)- (2-->4)-(methyl 3- deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosid)onate from the lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia*. *Carbohydr. Res.* 313, 21–27.

Jayol A, Saly M, Nordmann P, Ménard A, Poirel L, Dubois V (2017). *Hafnia*, an enterobacterial genus naturally resistant to colistin revealed by three susceptibility testing methods. *J Antimicrob Chemother* 72:2507-2511.

Jiang SS, Liu MC, Teng LJ, Wang WB, Hsueh PR, Liaw SJ (2010). *Proteus mirabilis pmrl*, an Rppa-regulated gene necessary for polymyxin B resistance, biofilm formation, and urothelial cell invasion. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1564-1571.

Jones JW, Shaffer SA, Ernst RK, Goodlett DR., Turecek F (2008). Determination of pyrophosphorylated forms of lipid A in Gram-negative bacteria using a multivariate mass spectrometric approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12742–12747.

Kato A, Chen HD, Latifi T, Groisman EA (2012). Reciprocal control between a bacterium's regulatory system and the modification status of its lipopolysaccharide. *Mol Cell* 47: 897–908.

Kato A, Groisman EA (2004). Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev.* 18: 2302–2313.

Kawasaki K, China K, Nishijima M (2007). Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide

aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 189: 4911–4919.

Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol Biol. Rev.* 69, 527–543.

Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, Madec JY, Jouy E (2013) What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? *Int J Antimicrob Agents* 42: 379-383

Keo T, Collins J, Kunwar P, Blaser MJ, Iovine NM (2011). Campylobacter capsule and lipooligosaccharide confer resistance to serum and cationic antimicrobials. *Virulence* 2:30-40

Kerrinnes T, Young BM, Leon C, Roux CM, Tran L, Atluri VL, Winter MG, Tsolis RM (2015). Phospholipase A1 modulates the cell envelope phospholipid content of *Brucella melitensis*, contributing to polymyxin resistance and pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:6717-24.

Kieffer N, Nordmann P, Moreno AM, Moreno LZ, Chaby R, Breton A, Tissières P, Poirel L (2018). Genetic and functional characterization of an MCR-3-like producing *Escherichia coli* recovered from swine, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 62:7.

Kim SH, Jia W, Parreira VR, Bishop RE, Gyles CL (2006). Phosphoethanolamine substitution in the lipid A of *Escherichia coli* O157:H7 and its association with PmrC. *Microbiology* 152: 657–666.

Koyama Y (1953) A new antibiotic substance, colistin. *Jap. Patent* 1546 (1952). *Chem Abstr.* 47:6097

Kruglov EA, Gautam S, Guerra MT, Nathanson MH (2011). Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates bile salt export pump activity in rat hepatocytes. *Hepatology.* 2011 Nov;54(5):1790-9.

Kus JV, Gebremedhin A, Dang V, Tran SL, Serbanescu A, Barnett Foster D (2011). Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 2011 Sep;193(17):4509-15.

Lacour S, Bechet E, Cozzone AJ, Mijakovic I, Grangeasse C (2008). Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS ONE* 3:e3053.

Lacour S, Doublet P, Obadia B, Cozzone AJ, Grangeasse C (2006). A novel role for protein-tyrosine kinase Etk from *Escherichia coli* K-12 related to polymyxin resistance. *Res. Microbiol.* 157: 637–641.

Landman D, Salamera J, Quale J (2013). Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 51: 4106-4111

- Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA** (2004). The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 186: 4124–4133.
- Li J, Hulth A, Nilsson LE, Börjesson S, Chen B, Bi Z, Wang Y, Schwarz S, Wu C** (2018). Occurrence of the mobile colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli* from household pigs in rural areas. *J Antimicrob Chemother* 73: 1721-1723.
- Li J, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K** (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 25:11-25.
- Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL** (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 6:589-601.
- Li J, Shi X, Yin W, Wang Y, Shen Z, Ding S, Wang SA** (2017 a). Multiplex SYBR Green Real-Time PCR Assay for the Detection of Three Colistin Resistance Genes from Cultured Bacteria, Feces, and Environment Samples. *Front Microbiol.* 27;8:2078.
- Li Y, Yan WJ, Liu SQ** (2017 b). [Investigation of colistin resistance gene mcr in gut bacteria from patients with acute diarrheal]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*;97:3720-3723.
- Liassine N, Assouvie L, Descombes MC, Tendon VD, Kieffer N, Poirel L, Nordmann P** (2017). Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. *Int J Infect Dis.* 51:4-5.
- Lin QY, Tsai YL, Liu MC, Hsueh PR, Liaw SJ** (2014). *Serratia marcescens* *arn*, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5181-5190.
- Ling Z, Yin W, Li H, Zhang Q, Wang X, Wang Z, Ke Y, Wang Y, Shen J** (2017). Chromosome-Mediated mcr-3 Variants in *Aeromonas veronii* from Chicken Meat. *Antimicrob Agents Chemother* 24:61.
- Litrup E, Kiil K, Hammerum AM, Roer L, Nielsen EM, Torpdahl M** (2017). Plasmid-borne colistin resistance gene mcr-3 in *Salmonella* isolates from human infections, Denmark, 2009-17. *Euro Surveill.* 3;22(31).
- Littlewood JM, Koch C, Lambert PA, Hoiby N, Elborn JS, Conway SP, Dinwiddie R, Duncan-Skingle F** (2000). A ten year review of colomycin. *Respiratoru Medicine.* 94: 632-640.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH,**

- Shen J** (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161–168.
- Loutet SA, Valvano MA** (2011). Extreme antimicrobial Peptide and polymyxin B resistance in the genus burkholderia. *Front Microbiol* 2:159..
- Lupo A, Saras E, Madec JY, Haenni M** (2018). Emergence of blaCTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. *J Antimicrob Chemother.* 1;73:867-872.
- Luque S, Grau S, Berenguer N, Horcajada JP, Sorlí L, Montero MM, Salas E** (2011). Luces y sombras en el uso de la colistina: falta mucho por conocer. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29 (4): 287-296.
- Malott RJ, Steen-Kinnaird BR, Lee TD, Speert DP** (2012). Identification of hopanoid biosynthesis genes involved in polymyxin resistance in *Burkholderia multivorans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 464–471.
- Mandrell RE, Apicella MA** (1993). “Lipooligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS”. *Immunobiology.* 187: 382–402.
- Mellon M, Benbrook C, Benbrook K** (2001). Hogging It! Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock, Cambridge: Union of Concerned Scientists Publications. Disponible en: http://www.ucsusa.org/food_and_environment/antibiotics_and_food/hogging-it-estimates-of-antimicrobial-abuse-in-livestock.html
- Moon K, Gottesman S** (2009). A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* 74, 1314–1330.
- Muyembe T, Vandepitte J, Desmyter J** (1973). Natural colistin resistance in *Edwardsiella tarda*. *Antimicrob Agents Chemother* 4(5):521-4.
- Nation RL, Velkov T, Li J** (2014). Colistin and polymyxin B: Peas in a pod, or chalk and cheese? *Clinical Infectious Disease.* 59: 88-94.
- Neu HC** (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science.* 257: 1064-1073.
- Novem V, Shui G, Wang D, Bendt AK, Sim SH, Liu Y, et al** (2009). Structural and biological diversity of lipopolysaccharides from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1420–1428.
- Nummila K, Kilpelainen I, Zahringer U, Vaara M, Helander IM** (1995). Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Mol Microbiol* 16, 271-278

- O'Hara CM, Brenner FW, Miller J** (2000) Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev.* 13:534-46.
- Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, Morand S, Rolain JM** (2016). Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:147.
- Ordooei JA, Shokouhi S, Sahraei Z** (2015) A review on colistin nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol.* 71: 801-810
- Ortega XP, Cardona ST, Brown AR, Loutet SA, Flannagan RS, Campopiano DJ, Govan JR, Valvano MA** (2007). A putative gene cluster for aminoarabinose biosynthesis is essential for *Burkholderia cenocepacia* viability. *J. Bacteriol.* 189: 3639–3644
- Ouellette AJ** (2005). Paneth cell alpha-defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine. *Springer Semin. Immunopathol.* 27:133–146.
- Perez JC, Groisman EA** (2007). Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 63, 283–293.
- Poirel L, Jayol A, Nordmann P** (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews* 30: 557–596.
- Pradel E, Parker CT, Schnaitman CA** (1992). The structure of the *rfaB*, *rfaI*, *rfaJ*, and *rfaS* genes of *Escherichia coli* K-12 and their roles in the assembly of the lipopolysaccharide core. *J Bacteriol* 174:4736-4745.
- Prescott J** (2006). History of Antimicrobial Usage in Agriculture: an Overview. 19-28. In Aarestrup F (Ed), *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. ASM Press, Washington, DC.
- Quesada A, Porrero MC, Téllez S, Palomo G, García M, Domínguez L** (2015). Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *JAntimicrob Chemother.* 70:71-74.
- Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, Campos MJ, García M, Píriz S, Sáez JL, Domínguez L** (2016). Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Res Vet Sci.* 105: 134-135.
- Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE** (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 295–329.
- Rastogi N, Potar MC, David HL** (1986). Antimycobacterial spectrum of colistin (polymyxin E). *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 137A: 45-53

- Rastogi N, Henrotte JG, David HL**(1987). Colistin (polymyxin E)-induced cell leakage in *Mycobacterium aurum*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. 263: 548-51
- Rastogi N, Potar MC, Henrotte JG, Franck G, David HL** (1988). Further studies on colistin (polymyxin E)-induced cell leakage in mycobacteria: Mg⁺⁺ efflux in *Mycobacterium avium* and its effects on drug-susceptibility, *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. 268: 251-8
- Regni CA, Roush RF, Miller DJ, Nourse A, Walsh CT, Schulman BA** (2009). How the MccB bacterial ancestor of ubiquitin E1 initiates biosynthesis of the microcin C7 antibiotic. *EMBO J*. 28:1953-64.
- Reynolds CM, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CR** (2005). A phosphoethanolamine transferase specific for the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residue of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Identification of the eptB gene and Ca²⁺ hypersensitivity of an eptB deletion mutant. *J. Biol. Chem.* 280, 21202–21211.
- Roer L, Hansen F, Stegger M, Sönksen UW, Hasman H, Hammerum AM** (2017) Novel mcr-3 variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014. *Euro Surveill* 22:31.
- Roland KL, Martin LE, Esther CR, Spitznagel JK**(1993). Spontaneous pmrA mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. *J. Bacteriol.* 175: 4154–4164.
- Sánchez-Benito R, Iglesias MR, Quijada NM, Campos MJ, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Pazos C, Rodríguez- Lázaro D, Garduño E, Domínguez L, Quesada A** (2017). *Escherichia coli* ST167 carrying plasmid mobilizable mcr-1 and blaCTX-M-15 resistance determinants isolated from a human respiratory infection. *Int J Antimicrob Agents*. 50:285-286.
- Schnaitman CA, Klena JD** (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enterobacteria. *Microbiol Rev* 57: 655-682
- Silipo A, Molinaro A, Cescutti P, Bedini E, Rizzo R, Parrilli M, Lanzetta R** (2005). Complete structural characterization of the lipid A fraction of a clinical strain of *B. cepacia* genomovar I lipopolysaccharide. *Glycobiology* 15: 561–570.
- Sorli L, Luque S, Grau S, Berenguer N, Segura C, Montero MM, Alvarez-Lerma F, Knobel H, Benito N, Horcajada JP** (2013). Trough colistin plasma level is an independent risk factor for nephrotoxicity: a prospective observational cohort study. *BMC Infect Dis*. 13:380.
- Stansly PG, Sepherd RG, White HJ** (1947). Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. *Bull. Johns Hopkins Hosp*. 81: 43

- Sun S, Negrea A, Rhen M, Andersson DI** (2009). Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 2298–2305.
- Tamayo R, Choudhury B, Septer A, Merighi M, Carlson R, Gunn JS** (2005a). Identification of *cptA*, a *PmrA*-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* 187: 3391–3399.
- Tegetmeyer HE, Jones SCP, Langford PR, Baltes N** (2008). *ISAp11*, a novel insertion element of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, prevents ApxIV-based serological detection of serotype 7 strain AP76. *Vet Microbiol* 128:342–353.
- Touze T, Tran AX, Hankins JV, Mengin-Lecreulx D, Trent MS** (2008). Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate. *Mol Microbiol* 67:264–277.
- Trent MS, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR** (2001). An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem* 276: 43122–43131.
- Von Graevenitz A, Nourbakhsh M** (1972). Antimicrobial resistance of the genera *Proteus*, *Providencia* and *Serratia* with special reference to multiple resistance patterns. *Med Microbiol Immunol* 157:142-148.
- Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, Zhang S, Shen J, Shen Z, Wang Y** (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* 7:122.
- Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KM** (2018). Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLoS One* 13(4):e0195281.
- Wösten MM, Kox LF, Chamnongpol S, Soncini FC, Groisman EA** (2000). A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* 103: 113–125.
- Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S** (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 7;21(27).
- Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M** (2012)- Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect.* 18: 18-29.
- Yamaguchi T, Kawahara R, Harada K, Teruya S, Nakayama T, Motooka D, Nakamura S, Nguyen PD, Kumeda Y, Van Dang C, Hirata K, Yamamoto Y**

(2018). The Presence of Colistin resistance gene *mcr-1* and *-3* in ESBL producing *Escherichia coli* isolated from food in Ho Chi Minh City, Vietnam. *FEMS Microbiol Lett.*

Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.*

Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio* 8:3.

Zhang J, Chen L, Wang J, Yassin AK, Butaye P, Kelly P, Gong J, Guo W, Li J, Li M, Yang F, Feng Z, Jiang P, Song C, Wang Y, You J, Yang Y, Price S, Qi K, Kang Y, Wang C (2018 a). Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry. *Sci Rep.*27.8:3705.

Zhang J, Chen L, Wang J, Butaye P, Huang K, Qiu H, Zhang X, Gong W, Wang C (2018 b). Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1* to *mcr-5*) in human vaginal swabs. *BMC Res Notes*11:143.

Zhang J, Wang J, Chen L, Yassin AK, Kelly P, Butaye P, Li J, Gong J, Cattley R, Qi K, Wang C (2017). Housefly (*Musca domestica*) and Blow Fly (*Protophormia terraenovae*) as Vectors of Bacteria Carrying Colistin Resistance Genes. *Appl Environ Microbiol.* 15;84.

Zhou Z, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Miller SI, Raetz CR (2001). Lipid modifications in polymyxin-resistant *Salmonella Typhimurium*: PmrA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem* 276:43111-21.

III. ANEXOS

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I: Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal

ANEXO II: Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *Salmonella enterica* de origen animal

ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal

ANEXO IV: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal

ANEXO V: Medicamentos autorizados y comercializados en España que contienen colistina para uso veterinario

ANEXO VI: Compendio de artículos

ANEXO I: Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal

UEx	VISA VET	Año	Origen	CMI (mg/L)		TG (min)		<i>pmrAB</i>	<i>mcr</i>	ISAPL I	Localización gen <i>mcr-1</i> (Tamaño (Kb))	IC Col	CMI Col Conj, (mg/L)	T XL1-Blue	CMI Col Trans, (mg/L)	BLEES	IC BLEES	CMI Col Conj BLEES (mg/L)	% E
				C	P B	LB	LB C												
Eco 53	ZTA15/01518EB1	2015	H.Porcino E	4	4	8,21	7,35	-	1	NO	P (33,3Kb)	9,7·10 ⁻⁴	4	-	-	CTXM	0	-	60,71
Eco 54	ZTA15/01704EB1	2015	H.Porcino E	4	4	8,49	6,88	-	1	NO	P (33 Kb)	0	-	SI	4	TEM	4,3·10 ⁻⁴	1	61,11
Eco 55	ZTA15/01825EB1	2015	H.Porcino E	4	4	8,2	7,01	V 161 V (<i>pmrB</i>)	1	NO	P (33-54 Kb)	4·10 ⁻²	4	-	-	TEM	0	-	66,66
Eco 56	ZTA14/01573EB	2014	H.Pavo	4	4	8,51	4,01	-	1	NO	P (33 Kb)	0	-	SI	4	SHV/TEM	4,310 ⁻⁷	4	80,76
Eco 57	ZTA15/00332EB1	2015	H.Porcino E	4	4	7,62	9,09	-	1	NO	P (33 Kb)	1,4·10 ⁻⁵	4	-	-	CTXM/TEM	2,4·10 ⁻⁴	4	68
Eco 58	ZTA15/00280EB1	2015	H.Porcino E	4	4	7,48	9,57	-	1	NO	P (33 Kb)	0	-	NO	-	CTXM	1,2·10 ⁻⁶	4	68,35
Eco 59	ZTA15/00279EB1	2015	H.Porcino E	4	4	7,52	9,15	-	1	SI	P(138-216 Kb)	0	-	NO	-	TEM	6,6·10 ⁻⁴	1	58,73
Eco 60	ZTA15/00235EB1	2015	H.Porcino E	4	4	9,35	6,61	-	-	-	-	0	-	-	-	CTXM/TEM	0	-	44,68
Eco 61	ZTA15/00233EB1	2015	H.Porcino E	4	4	7,53	9,18	V 161 V (<i>pmrB</i>)	1	NO	P (216 Kb)	2,3·10 ⁻¹	4	-	-	TEM	0	-	56
Eco 62	ZTA15/01286EC	2015	H.Porcino E	8	4	8,05	9,84	V 161 G (<i>pmrB</i>)	1	NO	P (33 Kb)	5,2·10 ⁻⁵	4	-	-	TEM	4,3·10 ⁻⁵	1	69,04
Eco 63	ZTA15/00700EC	2015	H.Porcino E	8	4	8,23	9,45	-	1	NO	P(138-216 Kb)	3,7·10 ⁻⁷	2	-	-	TEM	3,8·10 ⁻³	0,5	64
Eco 64	ZTA15/00702EC	2015	H.Porcino E	8	4	7,9	12,44	-	-	-	-	0	-	-	-	0	0	-	70
Eco 65	ZTA14/01340EB	2014	H.Pavo	4	4	6,96	7,54	-	1	NO	P (33 Kb)	4,6·10 ⁻⁹	4	-	-	CTXM/TEM	8·10 ⁻⁷	0,5	64,91
Eco 66	ZTA14/01336EB	2014	H.Pavo	4	4	7,15	6,19	-	1	NO	P (33 Kb)	0	-	NO	-	SHV/TEM	0	-	62
Eco 67	ZTA15/00539EC	2015	H.Porcino E	4	4	7,6	6,87	-	1	NO	P (33 Kb)	0	-	NO	-	TEM	7,6·10 ⁻²	0,25	50
Eco 68	ZTA15/00309EC	2015	H.Porcino E	4	2	7,4	9,15	-	1	NO	P (33 Kb)	3,8·10 ⁻⁷	4	-	-	0	2,5·10 ⁻⁵	4	69,35
Eco 69	ZTA14/01562EB	2014	H.Pavo	4	4	7,57	5,63	-	1	NO	P (33 Kb)	4,4·10 ⁻⁵	4	-	-	SHV/TEM	2,2·10 ⁻³	0,5	83,07
Eco 70	ZTA14/01312EB	2014	H.Pavo	4	4	7,69	5,73	-	1	NO	P (33-54 Kb)	1,4·10 ⁻⁸	4	-	-	SHV/TEM	2,1·10 ⁻⁷	0,5	69,56
Eco 71	ZTA14/01560EB	2014	H.Pavo	4	2	7,28	6,02	-	1	NO	P(33 Kb)	0	-	NO	-	SHV/TEM	0	-	71,23
Eco 72	ZTA16/00912COL1	2016	H.Pavo	4	4	7,61	9,31	-	1	NO	P (33 Kb)	4,3·10 ⁻¹	4	-	-	TEM	1,3·10 ⁻²	2	76,71
Eco 73	ZTA14/01557EC	2014	H.Pavo	4	4	6,97	9,21	-	1	NO	P (33 Kb)	2,2·10 ⁻⁴	2	-	-	TEM	3,3·10 ⁻²	1	73,52
Eco 74	ZTA14/01557EB	2014	H.Pavo	4	4	7,44	5,26	-	1	NO	P (33 Kb)	1,5·10 ⁻²	4	-	-	SHV/TEM	4,5·10 ⁻¹	0,5	63,33
Eco 75	ZTA14/01385EB	2014	H.Pavo	4	4	8,22	7,84	-	1	NO	P (33 Kb)	5,4·10 ⁻⁸	4	-	-	SHV/TEM	6·10 ⁻²	0,5	61,36
Eco 76	ZTA14/00271EB	2014	H.Pavo	4	4	7,52	7,02	-	1	NO	P (33 Kb)	5,2·10 ⁻³	4	-	-	SHV/TEM	1,4·10 ⁻⁴	0,5	82,05
Eco 77	ZTA14/01056EB	2014	H.Pavo	4	4	7,51	8,04	-	1	NO	P (33 Kb)	1,8·10 ⁻¹	4	-	-	SHV/TEM	1,6·10 ⁻²	0,5	75
Eco 78	ZTA14/01290EB	2014	H.Pavo	4	2	8,6	10,45	-	1	NO	P (104 Kb)	1,3·10 ⁻²	4	-	-	SHV/TEM	7·10 ⁻²	2	70,42
Eco 79	ZTA14/00808EB	2014	H.Pavo	4	4	7,22	7,28	-	1	NO	P (33 Kb)	7,1·10 ⁻¹	4	-	-	SHV/TEM	5,2·10 ⁻⁷	0,5	71,18
Eco 80	ZTA14/01217EC	2014	H.Pavo	4	4	8,45	9,04	-	1	NO	PI (33 Kb)	2,6·10 ⁻¹	2	-	-	TEM	0	-	80,48
Eco 81	ZTA14/00277EB	2014	H.Pavo	4	2	6,36	4,73	-	1 y 4	NO	P (33 Kb)	7·10 ⁻²	2	-	-	SHV/TEM	6,2·10 ⁻⁹	4	73,07
Eco 82	ZTA14/01286EB	2014	H.Pavo	4	4	8	6,02	-	1	NO	P (33 Kb)	0	-	NO	-	SHV/TEM	0	-	61,11
Eco 83	ZTA14/01296EB	2014	H.Pavo	4	4	8,74	6,18	-	1	NO	P(104-138 Kb)	1,8·10 ⁻⁷	4	-	-	TEM	1,7·10 ⁻³	0,5	69,23
Eco 84	ZTA14/01295EB	2014	H.Pavo	4	2	7,43	7,57	-	1	NO	P (33 kb)	0	-	SI	4	SHV/TEM	0	-	75
Eco 85	ZTA14/01001EC	2014	H.Pavo	4	4	7,39	8,09	-	1	NO	C	0	-	-	-	TEM	0	-	78
Eco 86	ZTA14/01204EB	2014	H.Pavo	8	2	8,5	8,21	-	1	NO	P (33 Kb)	0	-	-	-	SHV/TEM	6,4·10 ⁻⁸	4	57,14
Eco 87	ZTA14/00821EB	2014	H.Pavo	8	4	7,93	6,64	-	1	NO	P (33 Kb)	1,1·10 ⁻⁶	4	-	-	CTXM	4,2·10 ⁻²	0,5	61,29
Eco 88	ZTA14/01003EB	2014	H.Pavo	4	4	8,35	8,11	-	1	NO	P (33 Kb)	6·10 ⁻¹	4	-	-	TEM	1·10 ⁻¹	4	60,86

ANEXO I: Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal

UEx	VISAVET	Año	Origen	CMI (mg/L)		TG (min)		<i>pmrAB</i>	<i>mcr</i>	ISAPL I	Localización gen <i>mcr</i> (Tamaño (Kb))	IC Col	CMI Col Conj, (mg/L)	T XL1-Blue	CMI Col Trans, (mg/L)	BLEES	IC BLEES	CMI Col Conj BLEES (mg/L)	% E
				C	PB	LB	LB C												
Eco 89	ZTA14/01068EC	2014	H.Pavo	4	4	7,09	8,1	-	1	NO	P (33 Kb)	$1 \cdot 10^{-1}$	2	-	-	TEM	$1,2 \cdot 10^{-1}$	2	77,77
Eco 90	ZTA14/00866EB	2014	H.Pavo	4	2	7,63	9,15	-	1	NO	P (33 Kb)	$1,3 \cdot 10^{-8}$	2	-	-	SHV	$1,8 \cdot 10^{-5}$	4	74,07
Eco 91	ZTA14/01143EB	2014	H.Pavo	4	2	8,36	7,81	-	1	SI	P (20 Kb)	$5,5 \cdot 10^{-2}$	4	-	-	SHV/TEM	$9 \cdot 10^{-2}$	0,5	71,11
Eco 92	ZTA15/00750EB1	2015	H.Porcino E	8	4	6,1	8,49	<i>pmrB</i> (H-2-R)+ <i>pmrB</i> (A-360-V)	4	NO	P	0	-	SI	4	CTXM	$7,1 \cdot 10^{-9}$	4	76,47
Eco 135	ZTA16/00913COL1	2016	H.Pavo	4	4	8,49	9,13	-	1	NO	P (20 Kb)	$1,3 \cdot 10^{-1}$	2	-	-	TEM	$1,3 \cdot 10^{-1}$	4	68,42
Eco 136	ZTA16/00925COL1	2016	H.Pavo	4	4	7,18	9,18	-	1	NO	P (33 Kb)	$4,3 \cdot 10^{-1}$	2	--	-	TEM	$1,8 \cdot 10^{-8}$	4	62,12
Eco 137	ZTA16/01190COL2	2016	H.Pavo	4	4	8	9,17	-	1	NO	P (33 Kb)	$1,6 \cdot 10^{-1}$	2	-	-	TEM	$5,9 \cdot 10^{-9}$	4	61,29
Eco 138	ZTA16/01247COL1	2016	H.Pavo	8	8	7,98	10,16	-	1	NO	C	$1,5 \cdot 10^{-8}$	2	-	-	TEM	$9,5 \cdot 10^{-3}$	4	60
Eco 139	ZTA16/01546COL1	2016	H.Pavo	4	4	10,12	11,25	-	1	NO	P (33 Kb)	$1,2 \cdot 10^{-1}$	4	-	-	TEM	$1,3 \cdot 10^{-1}$	0,25	61,22
Eco 140	ZTA16/02147COL1	2016	H.Pavo	4	4	8,87	11,99	-	1	NO	P (33 Kb)	0	-	NO	-	TEM	0	-	66,66

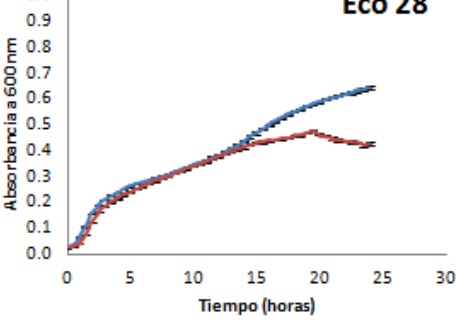
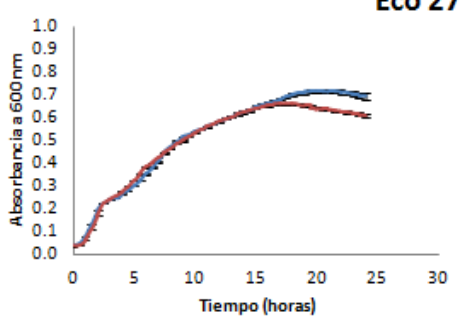
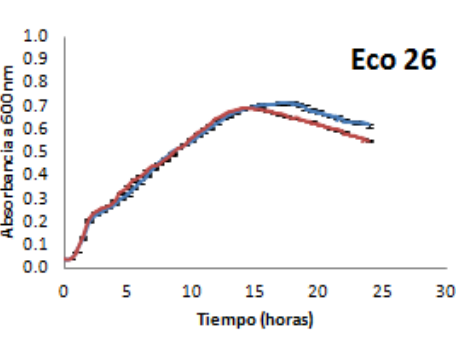
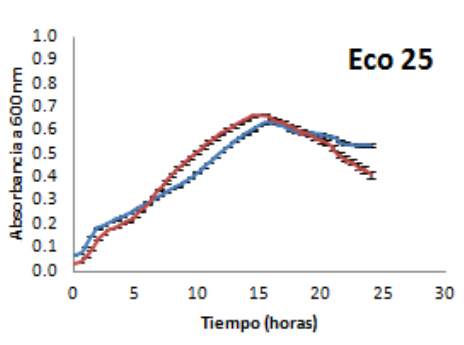
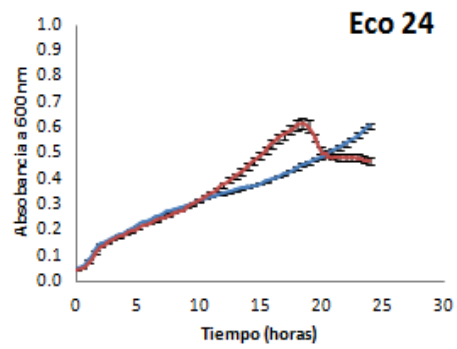
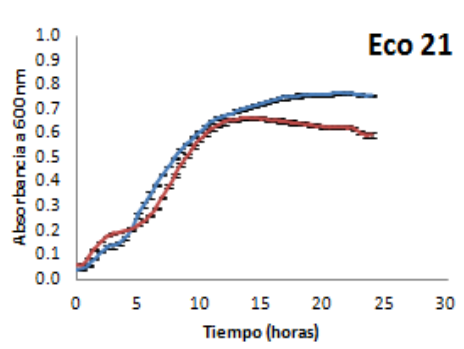
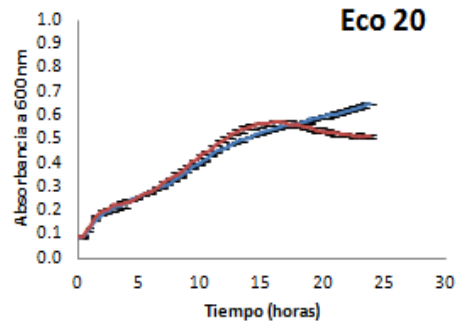
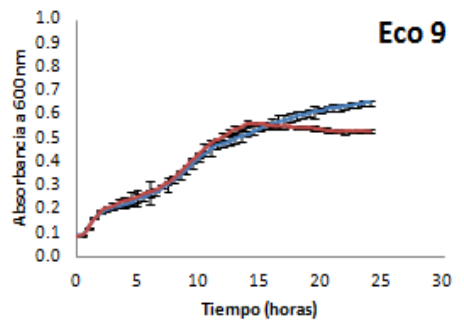
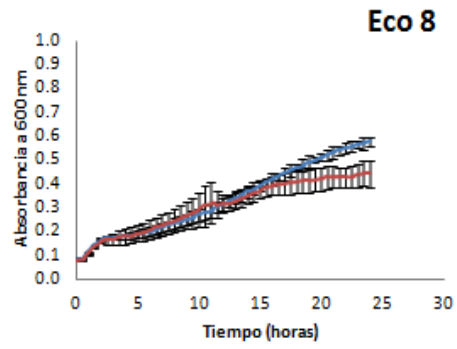
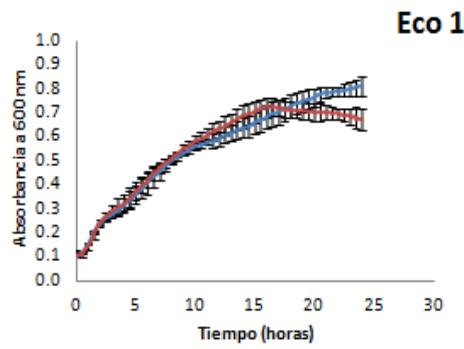
Resumen genotípico y fenotípico de cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina de origen animal. Donde: UEx, indica la nomenclatura de la UEx; VISAVET, indica la nomenclatura de VISAVET; Año, indica el año de aislamiento de la cepa; Origen, indica la procedencia de la cepa (H Pavo, heces de pavo; H Porcino E, heces de porcino de engorde; H Bovino, heces de bovino); CMI, concentración mínima inhibitoria de colistina (C) y polimixina B (PB); TG, tasa de generación en medio sin antibiótico (LB) y medio con 2 mg/L de colistina (LB C); *pmrAB*, polimorfismos en el sistema *pmrAB*; *mcr*, indica el tipo de gen *mcr* presente en la cepa; ISAPL I, indica la presencia o no de la inserción ISAPL I; Localización gen *mcr*, donde P indica que está en el plásmido y C indica que está en el cromosoma; IC Col, indica el índice de conjugación para determinantes de resistencia a colistina; CMI Col Conj, indica la CMI de colistina de los conjugantes resistentes a colistina; T XL1-Blue, indica transformación de la cepa *Escherichia coli* XL1-Blue con ADN plasmídico; CMI Col Trans, CMI de colistina de los transformantes obtenidos; BLEES, indica el tipo de betalactamasa presente; IC BLEES, indica el índice de conjugación para determinantes de resistencia a betalactámicos; CMI Col Conj BLEES, indica la CMI de colistina de los conjugantes resistentes a betalactámicos; % E, indica el porcentaje de estabilidad de la cepa en el octavo ciclo de crecimiento sin antibiótico. Las cepas Eco 9, Eco 21 y Eco 60 están en la categoría B de estabilidad; El resto de cepas están en la categoría A de estabilidad. No se realizó la hibridación con la sonda para *mcr-4* para determinar el tamaño del plásmido.

ANEXO II: Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *Salmonella enterica* de origen animal

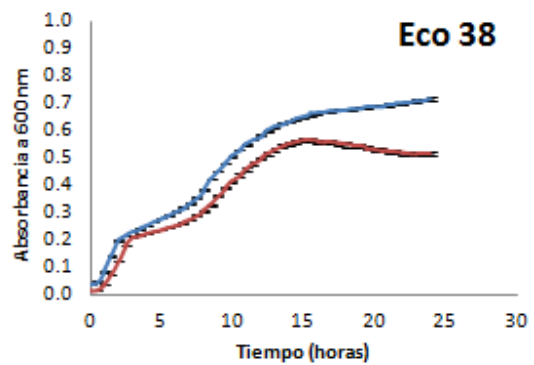
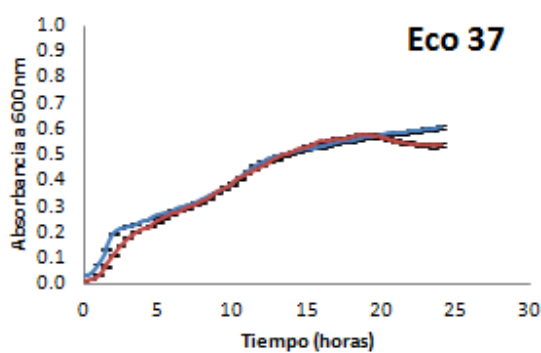
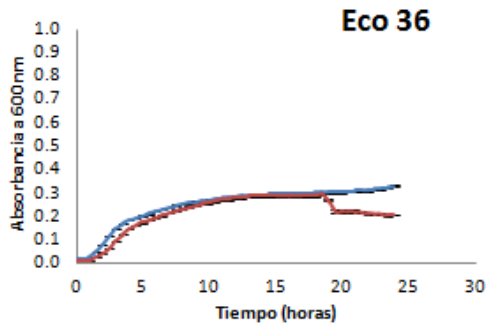
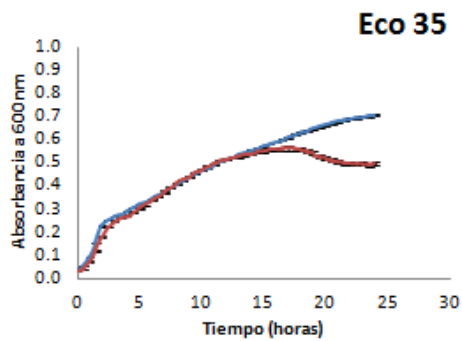
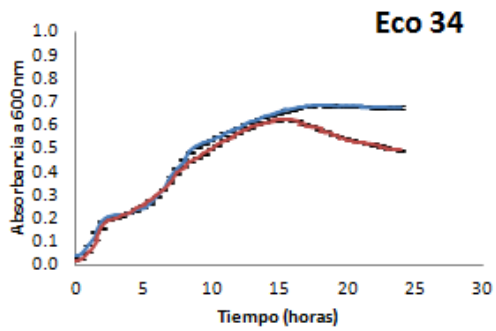
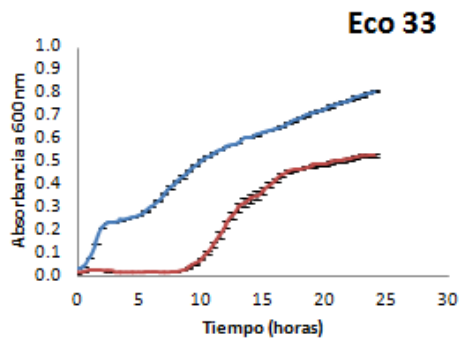
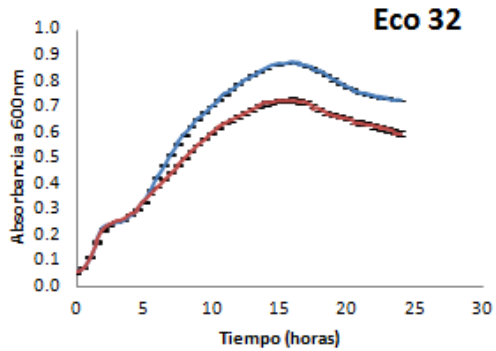
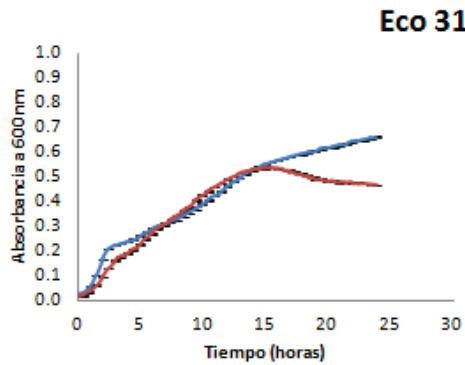
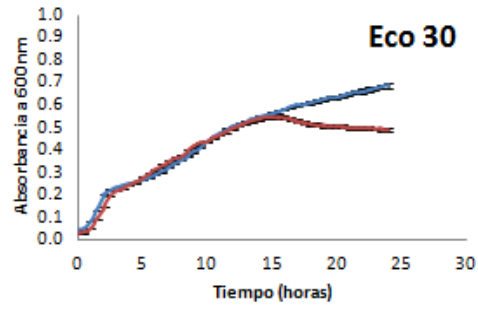
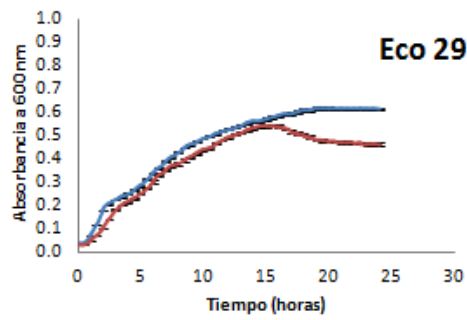
UEx	VISAVET	Año	Origen	Especie	CMI (mg/L)		TG (min)		pmrAB	mcr	ISAPL I	Localización gen mcr-1 (Tamaño (Kb))	IC Col	CMI Col Conj, (mg/L)	T XL1 Blue	% E	CE
					C	PB	LB	LB C									
Sal 1	ZTA09/00762SM2	2009	H, Porcino E	S, typhimurium	8	8	9,62	9,05	-	1	No	P (60 Kb)	1,2·10 ⁻²	4	-	80,20	A
Sal 2	ZTA10/00723 SM2	2010	G, Cerdo	S, rissen	8	8	9,24	8,53	-	1	No	P (60 Kb)	1,7·10 ⁻²	4	-	50	A
Sal 3	ZTA10/00996 SM2	2010	G, Cerdo	S, typhimurium	8	8	8,51	8,5	-	1	No	P (60 Kb)	3,8·10 ⁻¹	4	-	59,02	A
Sal 4	ZTA11/01078SM2	2011	G, Cerdo	S, typhimurium	8	4	8,63	8,5	-	1	No	P (60 Kb)	8,1·10 ⁻¹	4	-	70,37	A
Sal 5	ZTA14/00045	2014	LRSP	S, typhimurium monofasica	8	4	9,51	8,62	-	1	No	P (60 Kb)	5,9·10 ⁻²	4	-	54,44	A
Sal 7	ZTA13/01772-4SR2	2013	C, Huevo	S, enteritidis	4	4	8,06	6,16	-	-	-	-	0	-	No	41,56	B
Sal 8	ZTA13/01834-5SR2	2013	C, Huevo	S, enteritidis	4	4	8,57	8,53	-	-	-	-	0	-	No	1	C
Sal 9	ZTA13/01839-4SR2	2013	C, Huevo	S, enteritidis	4	4	9,08	8,27	-	-	-	-	0	-	No	0	C
Sal 16	ZTA14/00566	2014	LRSP	S, typhimurium monofasica	4	4	11,97	10,97	L 23 Q (pmrB)	-	-	-	0	-	No	11,02	B
Sal 17	ZTA15/00163	2015	LRSP	S, enteritidis	4	4	11,85	9,77	-	-	-	-	0	-	No	13,18	B
Sal 18	ZTA15/01880-2SR2	2015	C, Huevo	S, enteritidis	4	4	12,53	9,23	-	-	-	-	0	-	No	8,88	C
Sal 19	ZTA15/01568-4SR2	2015	C, Huevo	S, enteritidis	4	8	13,46	9,72	-	-	-	-	0	-	No	0	C
Sal 20	ZTA14/02014-2SR2	2014	C, Huevo	S, enteritidis	4	16	11,85	12,05	V 161 G (pmrB)	-	-	-	0	-	No	1,84	C
Sal 21	ZTA15/00213-1SM2	2015	H, Bovino	S, rissen	4	16	18,68	169	-	1	No	P (60 Kb)	0	-	No	55	A
Sal 22	ZTA14/02029-2SR2	2014	C, Huevo	S, enteritidis	4	8	12,46	9,69	-	-	-	-	0	-	No	1,38	C
Sal 23	ZTA14/02021-5SR2	2014	C, Huevo	S, enteritidis	4	8	10,79	9,56	-	-	-	-	0	-	No	2,18	C
Sal 24	ZTA14/02013-5SR2	2014	C, Huevo	S, enteritidis	4	8	9,9	24,34	L 23 Q (pmrB)	-	-	-	0	-	No	1,20	C
Sal 25	ZTA14/02013-1SR2	2014	C, Huevo	S, enteritidis	4	4	10,18	15,09	-	-	-	-	0	-	No	0,84	C
Sal 26	ZTA14/01623-2SK2	2014	C, Huevo	S, enteritidis	4	8	14,87	14,06	-	-	-	-	0	-	No	0	C
Sal 27	ZTA14/01612-2SK2	2014	C, Huevo	S, enteritidis	4	8	13,54	41,25	-	-	-	-	0	-	No	0	C
Sal 28	ZTA14/01520-2SR2	2014	C, Huevo	S, enteritidis	8	8	11,07	14,93	D 82 Y (pmrA)	-	-	-	0	-	No	13	B
Sal 29	ZTA14/01520-3SR2	2014	C, Huevo	S, enteritidis	4	8	12,74	12,35	R 81 C (pmrA)	-	-	-	0	-	No	0	C
Sal 30	ZTA11/02475SM2	2011	G, Cerdo	S, typhimurium monofasica	4	8	10,91	21	-	1	No	P (60 Kb)	2,06·10 ⁻³	4	-	28,30	B
Sal 31	ZTA16/02392-5SR2	2016	C, Huevo	S, enteritidis	8	4	32,38	17,72	-	-	-	-	0	-	No	1,79	C
Sal 32	ZTA16/02392-1SR2	2016	C, Huevo	S, enteritidis	4	4	10,88	10,16	-	-	-	-	0	-	No	4,71	C
Sal 33	ZTA16/03000-4SR2	2016	C, Huevo	S, enteritidis	4	4	8,05	8,93	-	-	-	-	0	-	No	59,76	A
Sal 35	ZTA14/01989	2014	C, Porcino	S, typhimurium monofasica	8	8	9,94	8,51	-	-	-	-	0	-	No	67,57	A
Sal 36	ZTA15/00163	2015	C, Ave	S, enteritidis	4	4	7,89	6,07	-	-	-	-	0	-	No	58,16	A

Resumen genotípico y fenotípico de cepas de *Salmonella enterica* resistentes a colistina de origen animal. Donde: UEx, indica la nomenclatura de la UEx; VISAVET, indica la nomenclatura de VISAVET; Año, indica el año de aislamiento de la cepa; Origen, indica la procedencia de la cepa (H Porcino E, heces de porcino de engorde; H Bovino, heces de bovino; G. Cerdo, ganglios de cerdo; C. Huevo, cáscara de huevo; LRSP, laboratorio regional de Salud Pública; C. Porcino, carne de porcino; C. Ave, carne de ave); CMI, concentración mínima inhibitoria de colistina (C) y polimixina B (PB); TG, tasa de generación en medio sin antibiótico (LB) y medio con 2 mg/L de colistina (LB C); pmrAB, polimorfismos en el sistema pmrAB; mcr, indica el tipo de gen mcr presente en la cepa; ISAPL I, indica la presencia o no de la inserción ISAPL I; Localización gen mcr, donde P indica que está en el plásmido y C indica que está en el cromosoma; IC Col, indica el índice de conjugación para determinantes de resistencia a colistina; CMI Col Conj, indica la CMI de colistina de los conjugantes resistentes a colistina; T XL1 Blue, indica transformación de cepa *Escherichia coli* XL1 Blue con ADN plasmídico; % E, indica el porcentaje de estabilidad de la cepa en el octavo ciclo de crecimiento sin antibiótico; CE, indica la categoría de estabilidad en la que se encuentran las cepas.

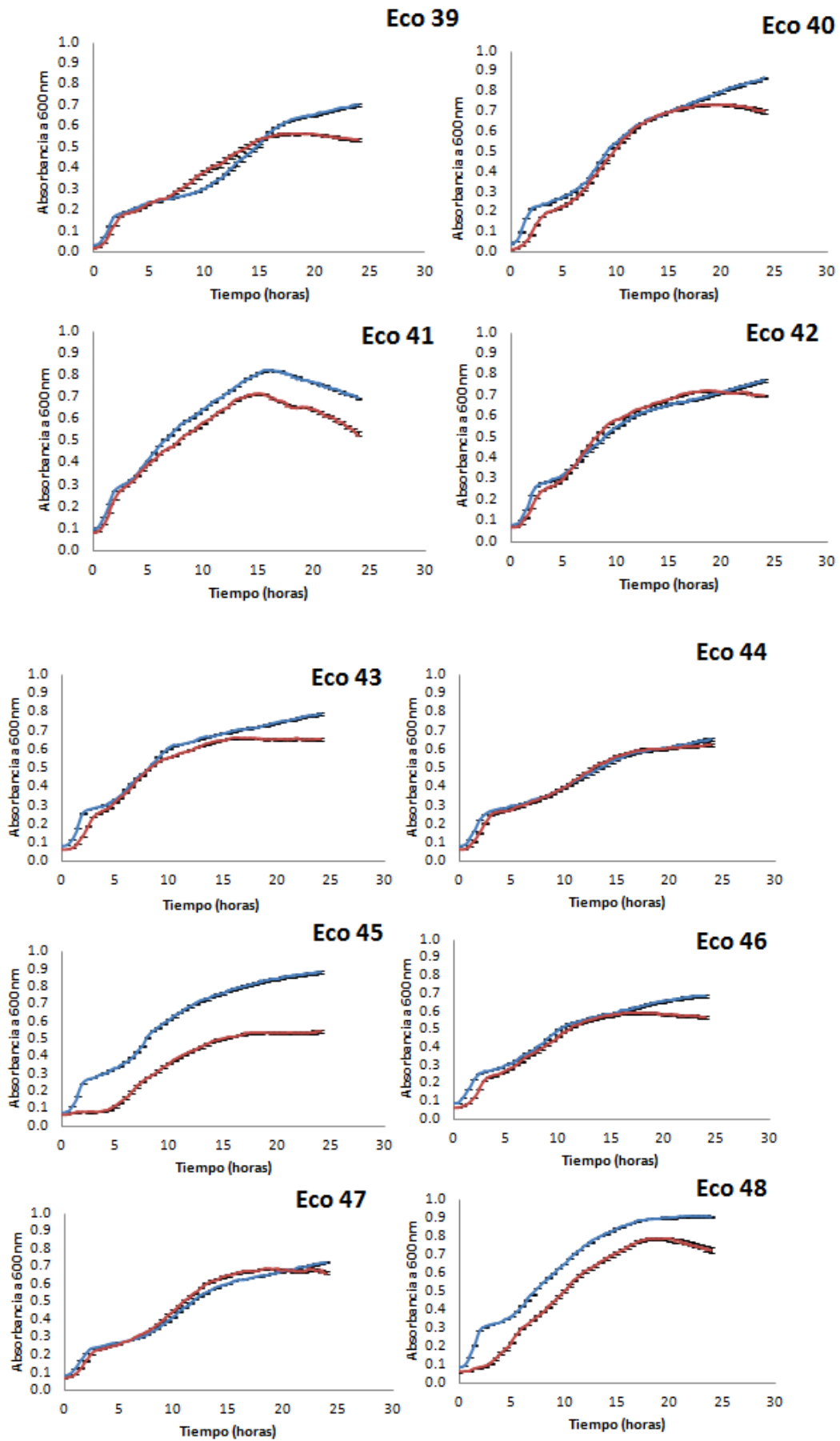
ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



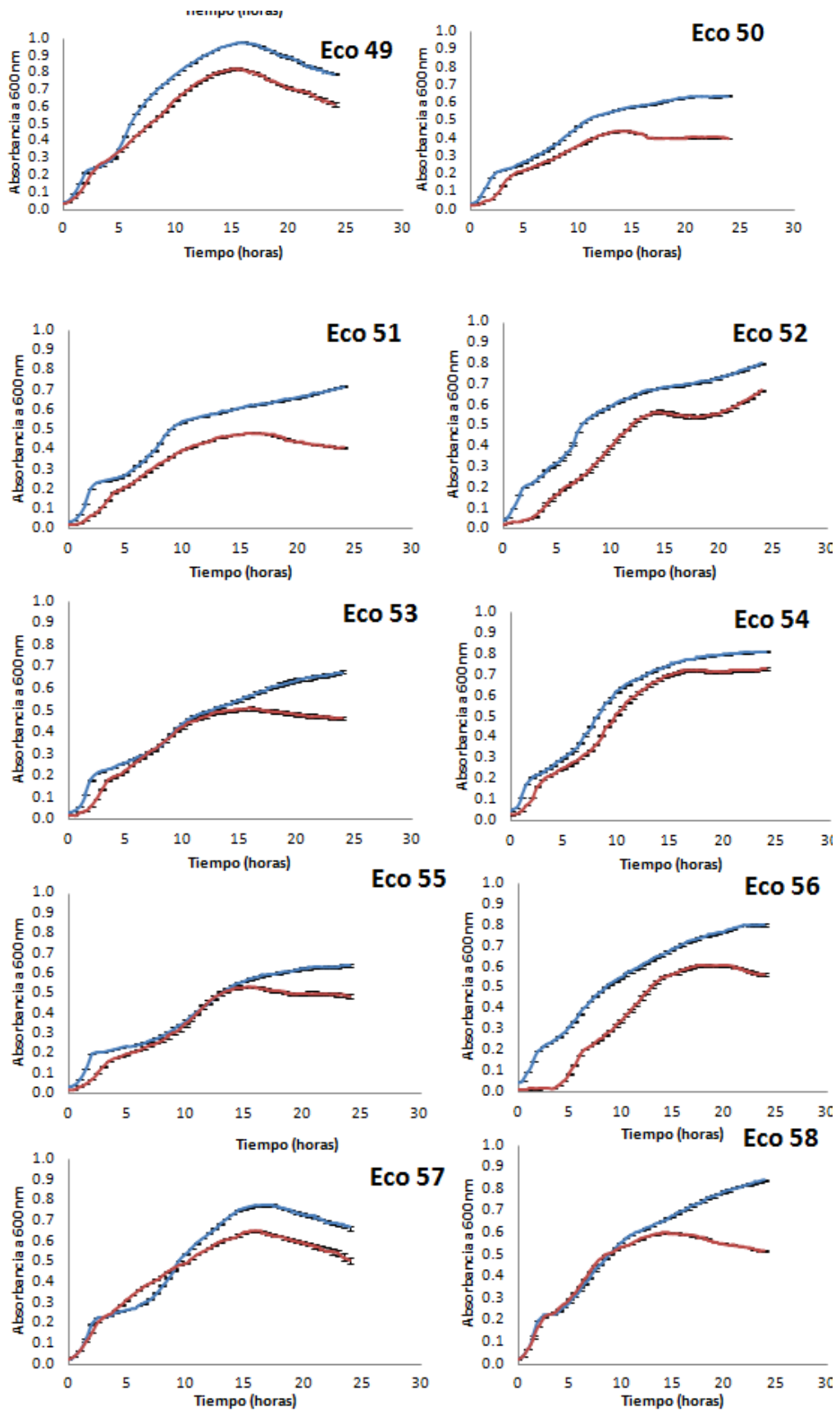
ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



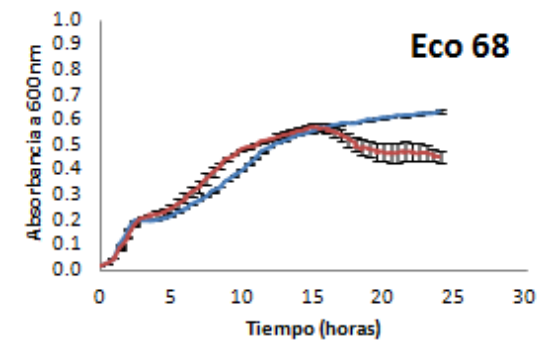
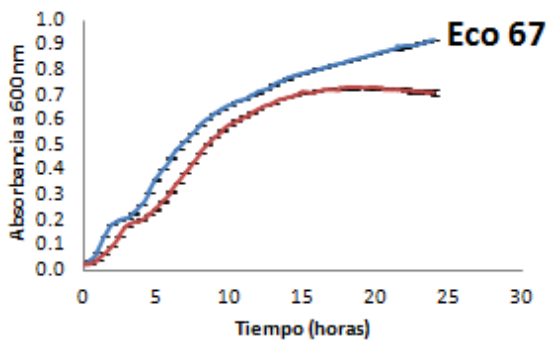
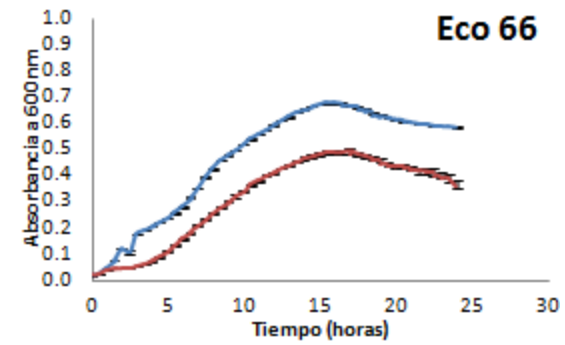
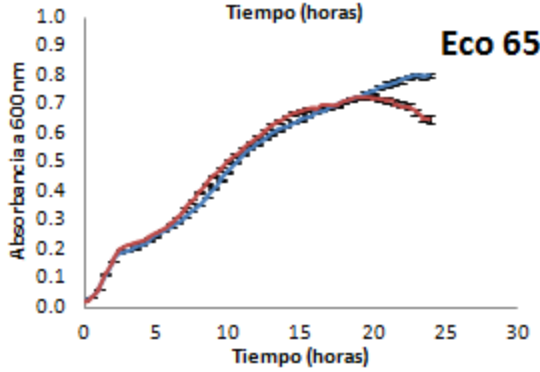
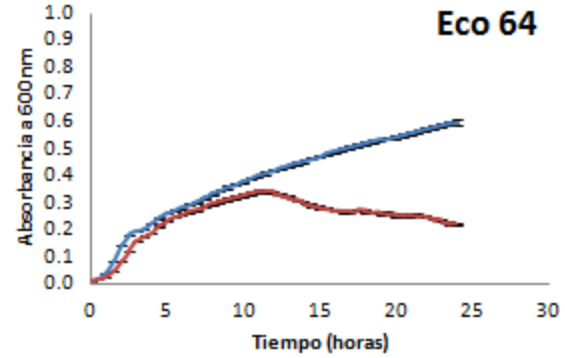
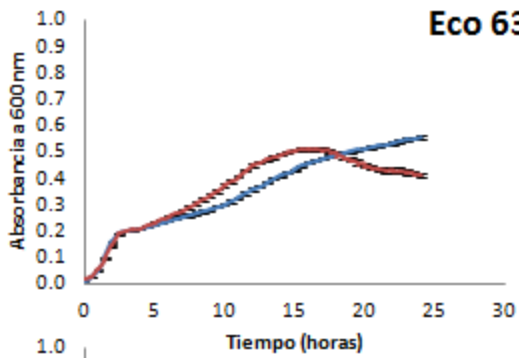
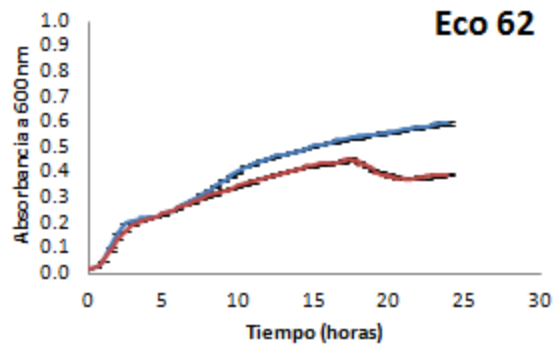
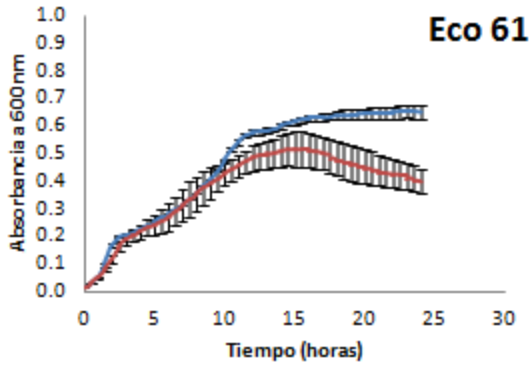
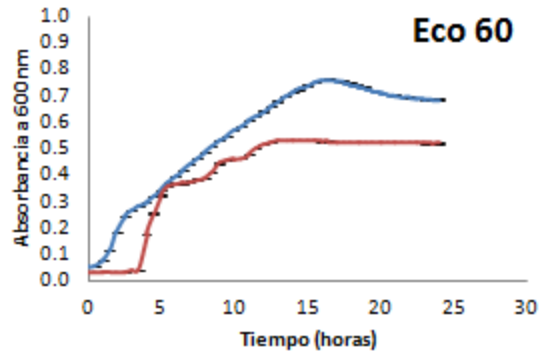
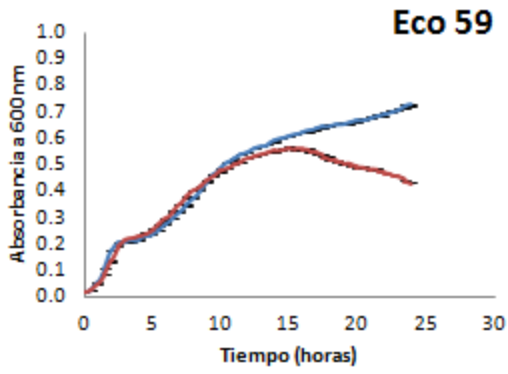
ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



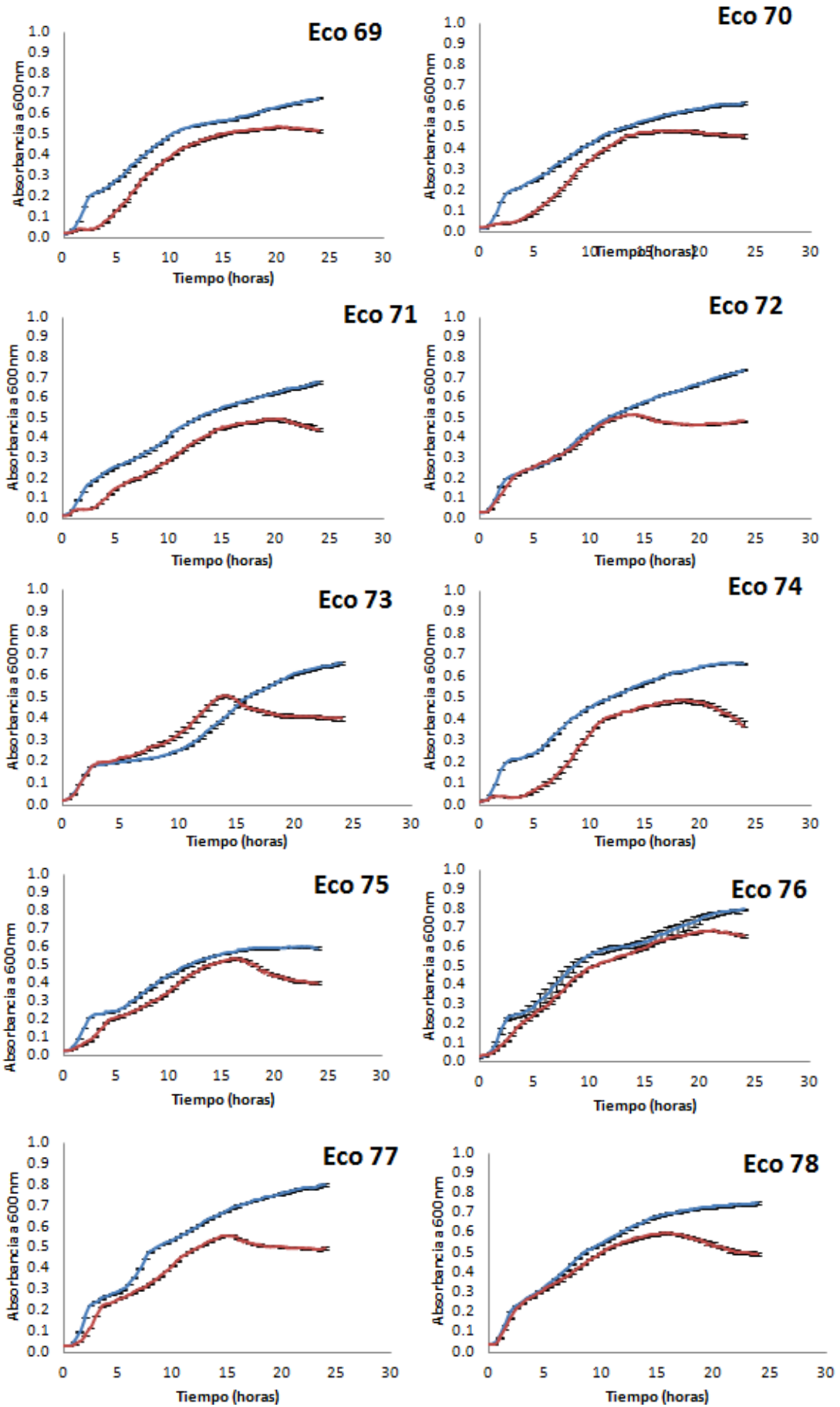
ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



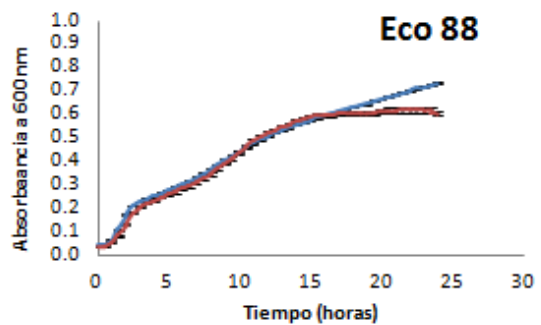
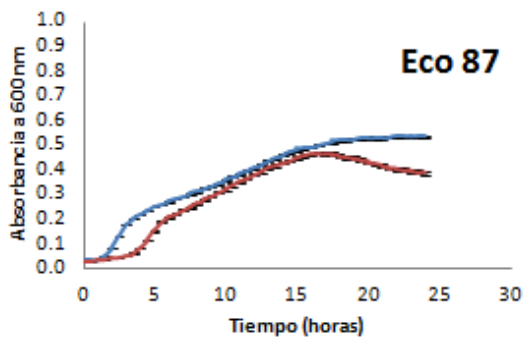
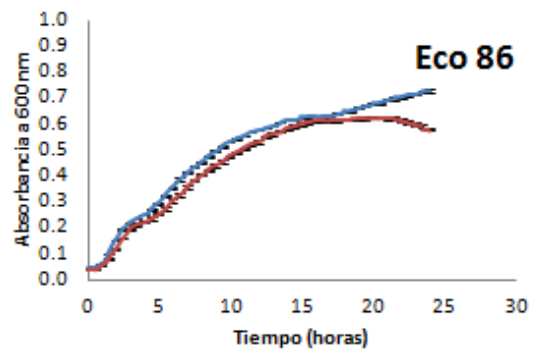
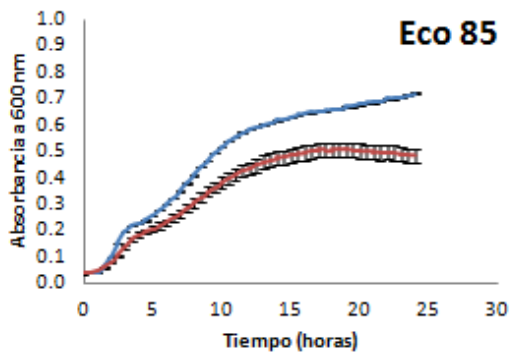
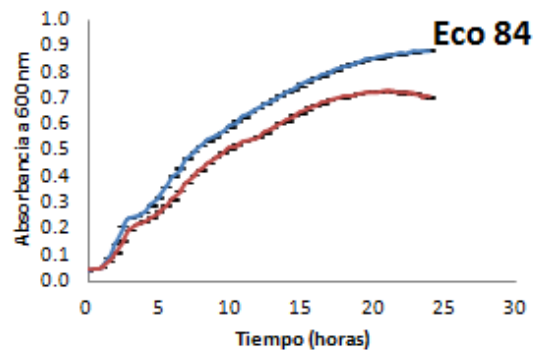
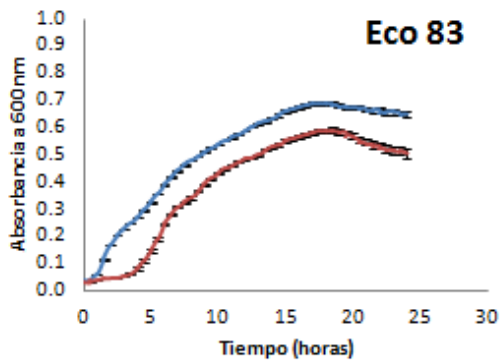
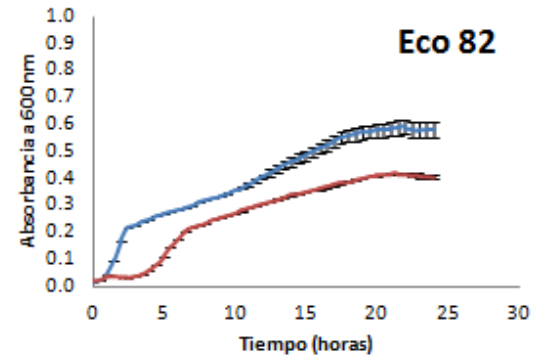
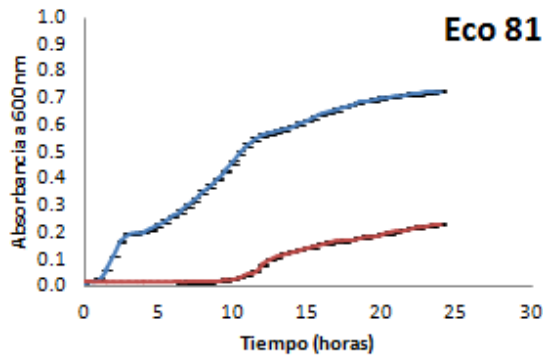
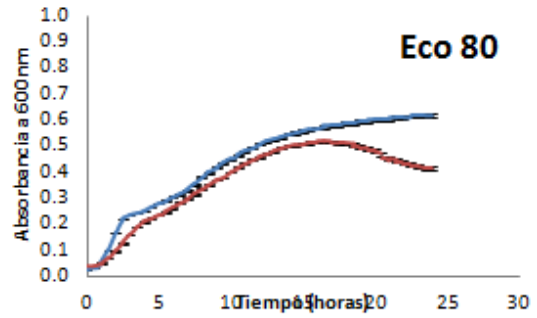
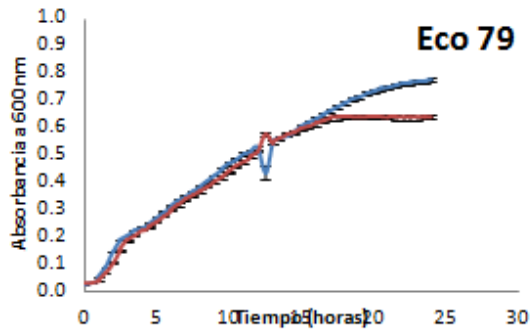
ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



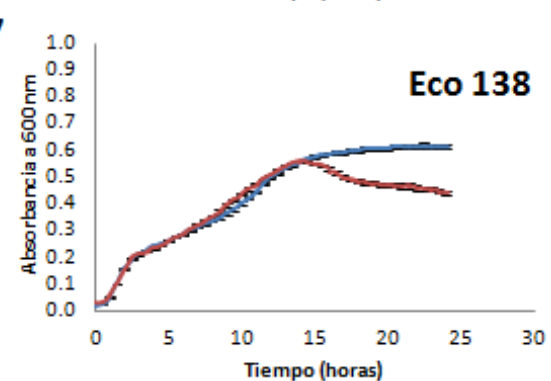
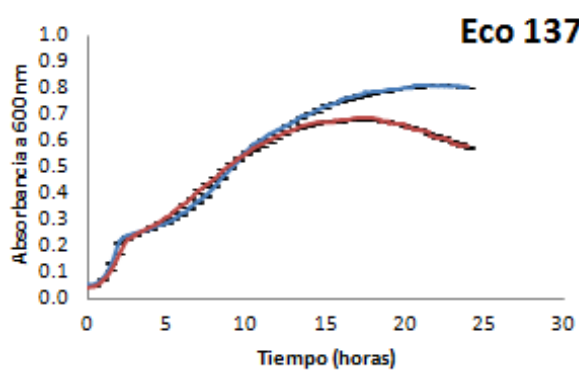
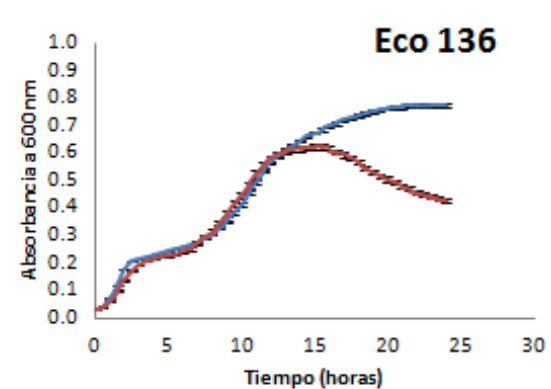
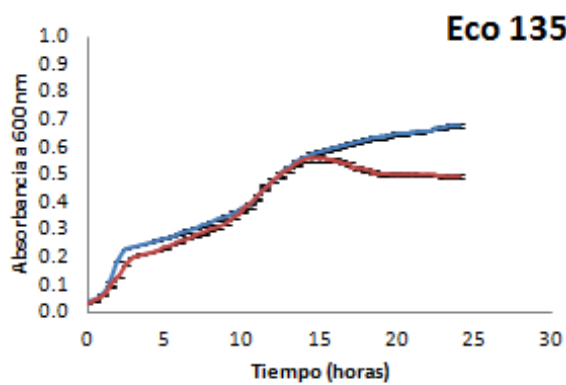
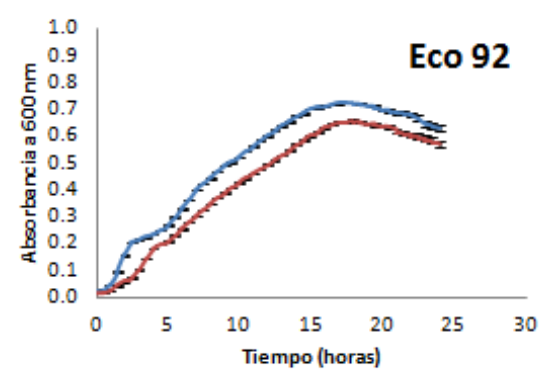
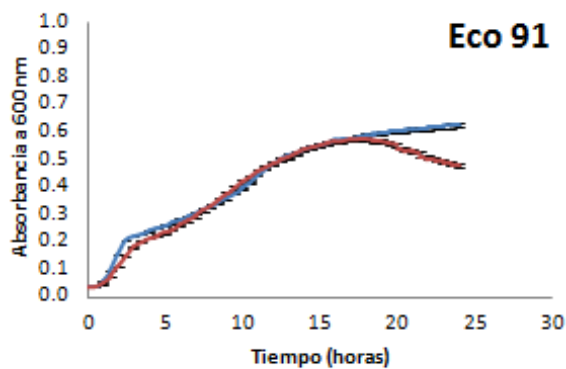
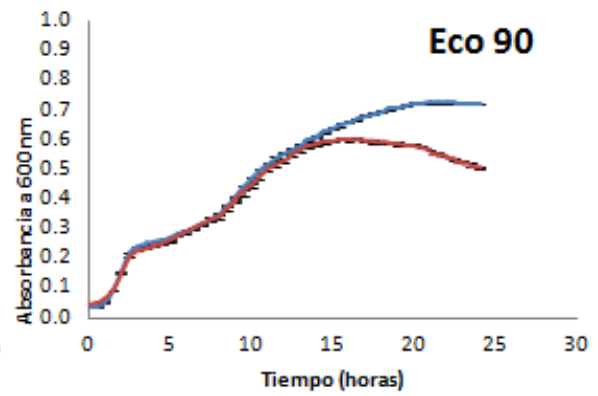
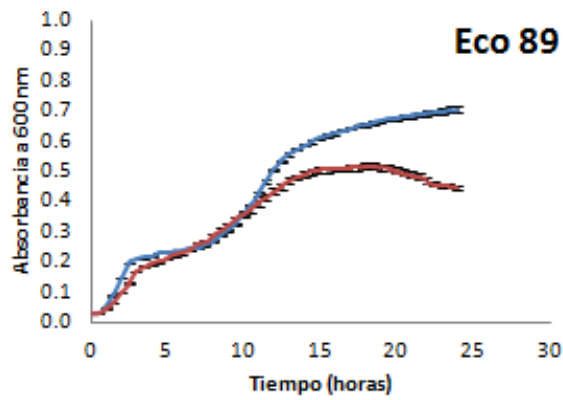
ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



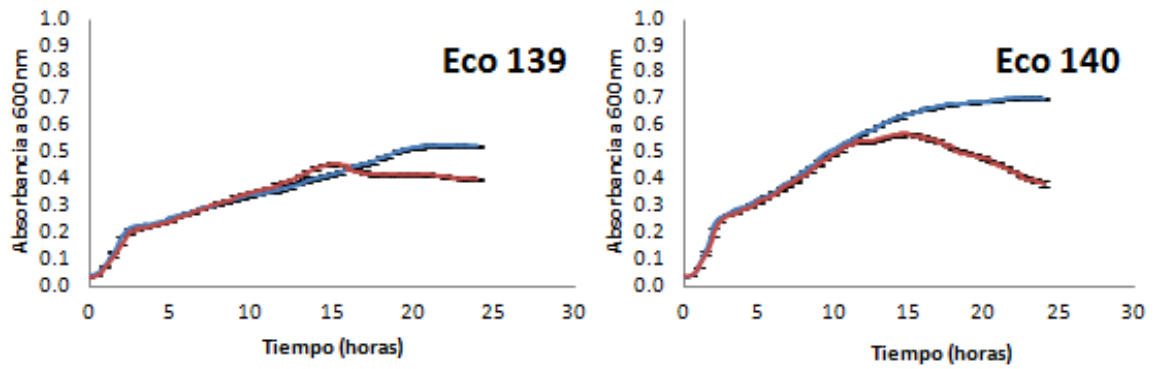
ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal

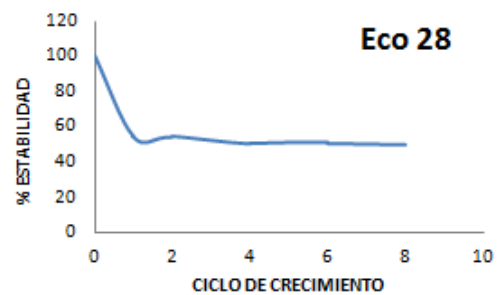
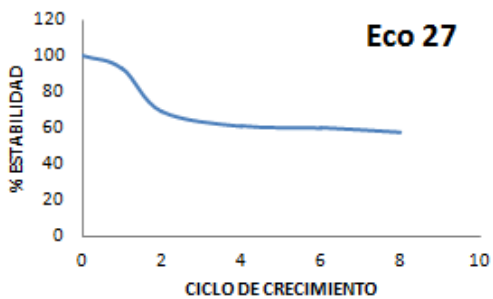
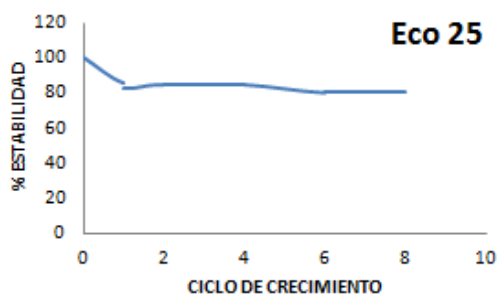
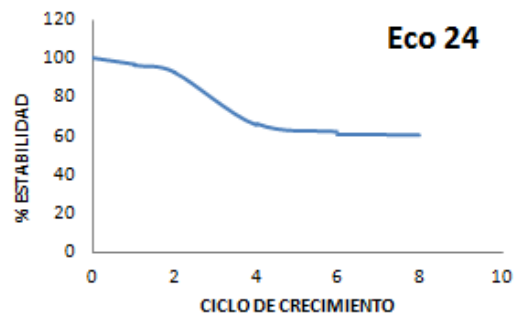
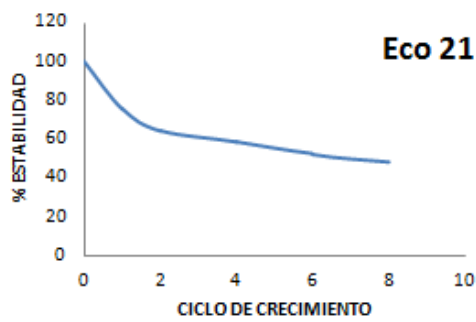
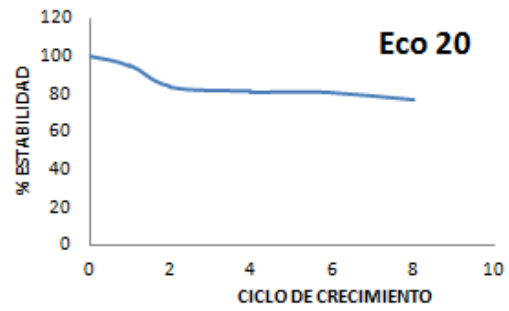
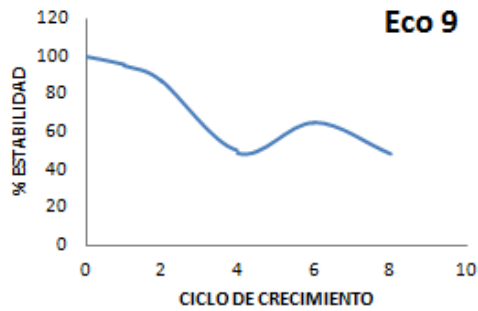
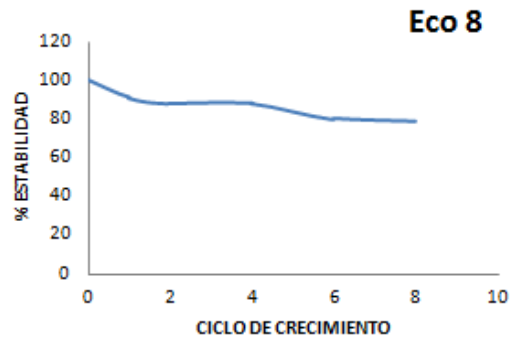
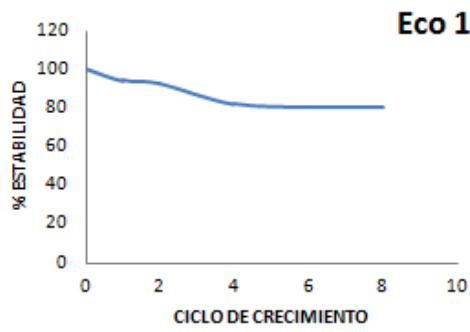


ANEXO III: Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de colistina de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal

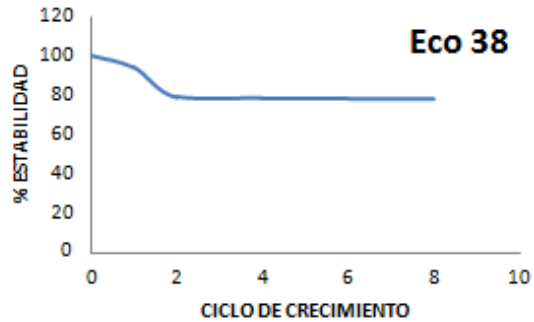
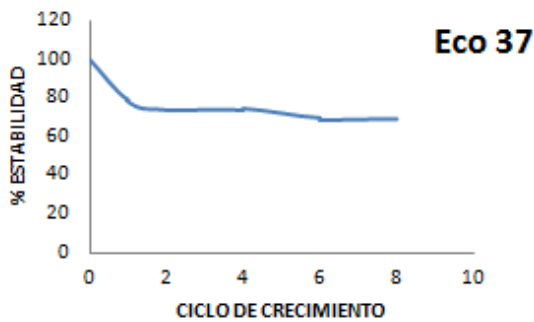
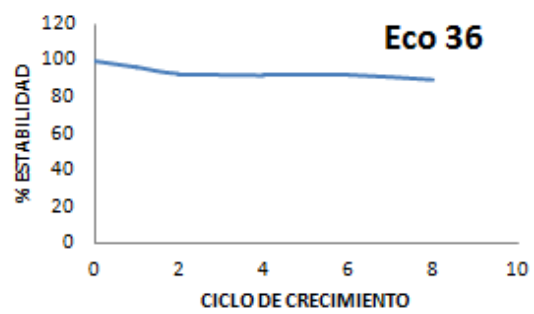
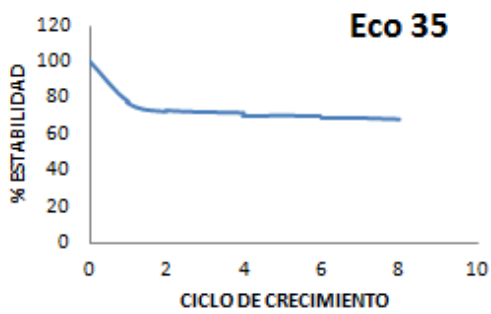
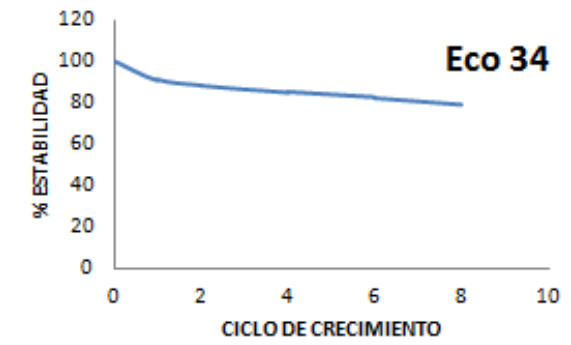
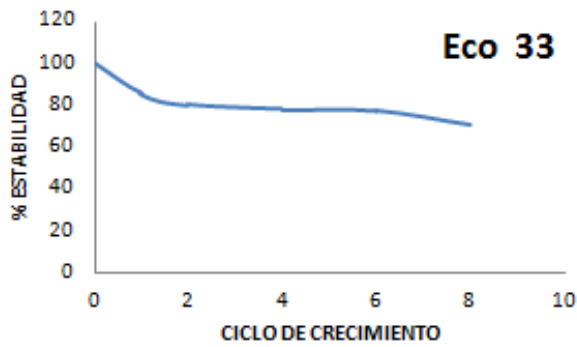
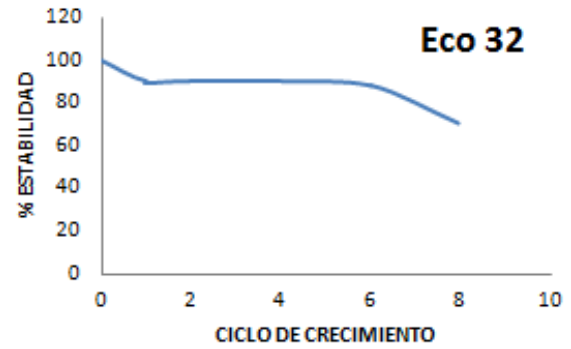
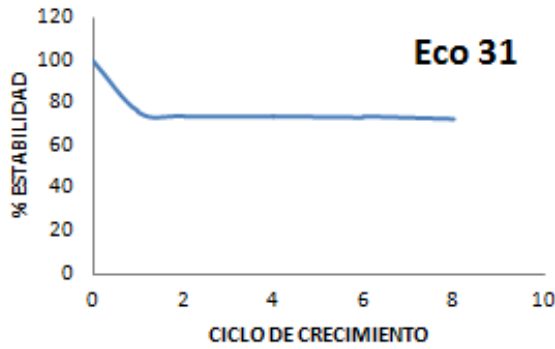
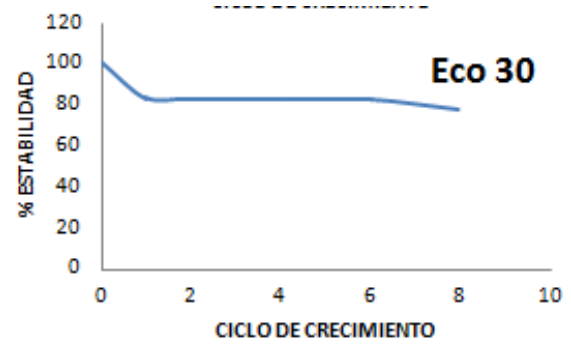
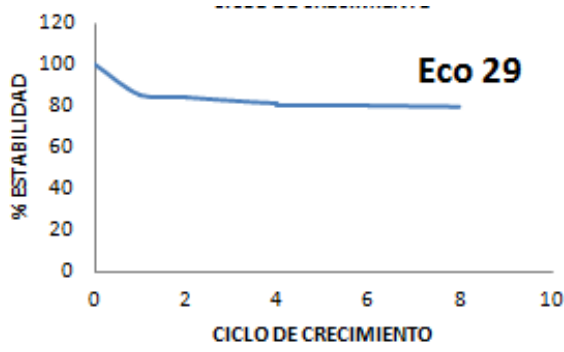


Representación gráfica del crecimiento bacteriano de las cepas de *Escherichia coli* procedentes de origen animal. Donde el color azul representa el crecimiento en medio LB sin colistina y el color rojo representa el crecimiento de las cepas bacterianas en medio LB suplementado con 2 mg/L de colistina.

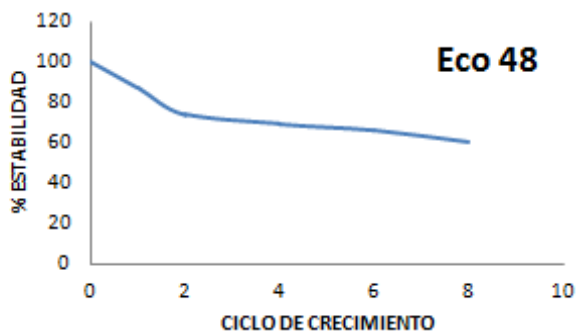
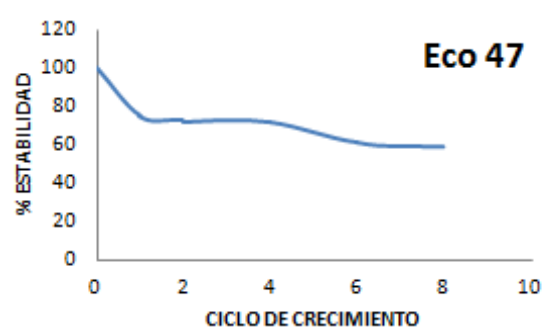
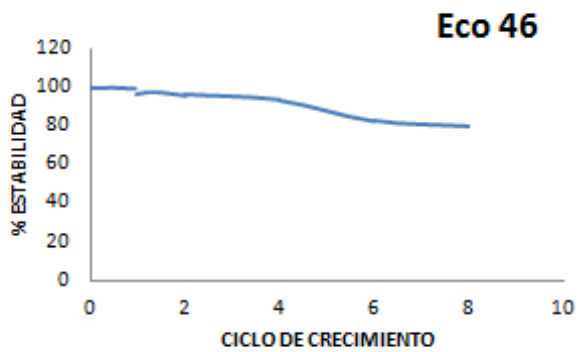
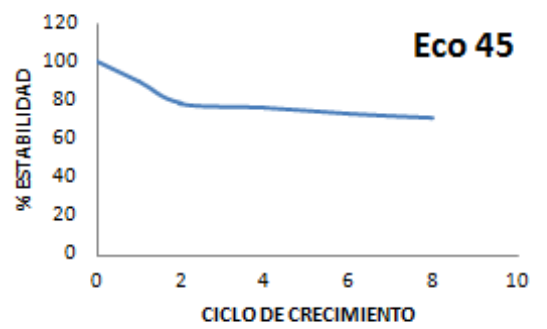
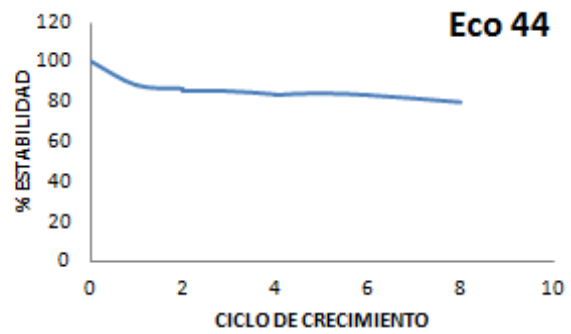
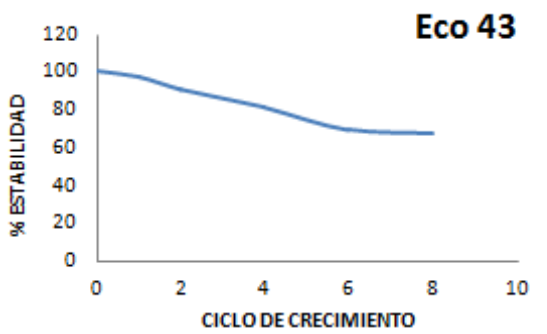
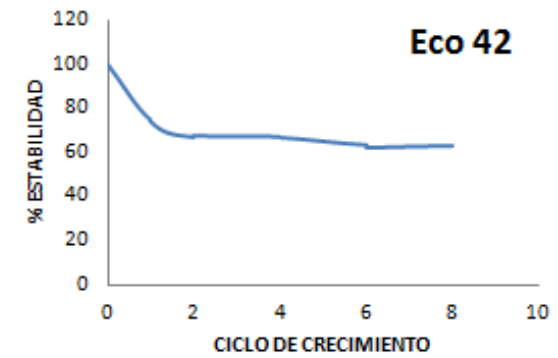
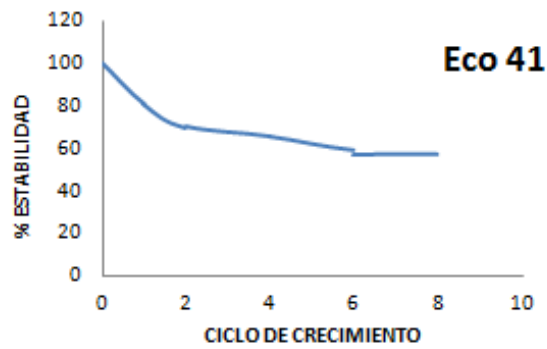
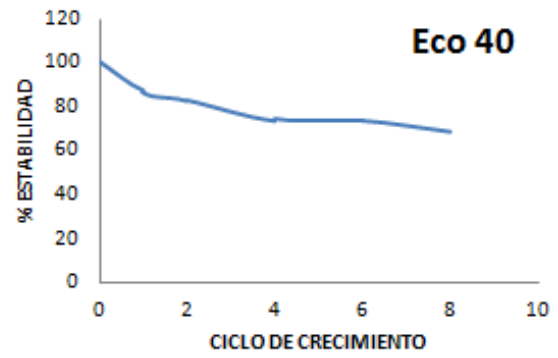
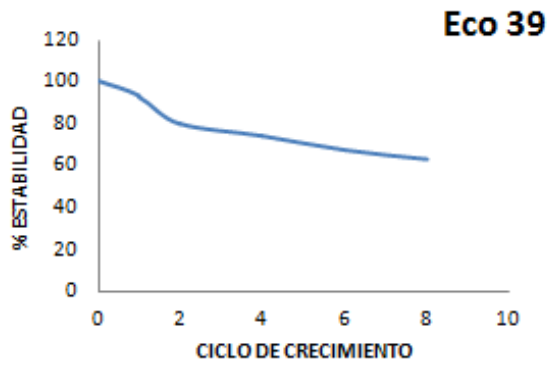
ANEXO IV: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



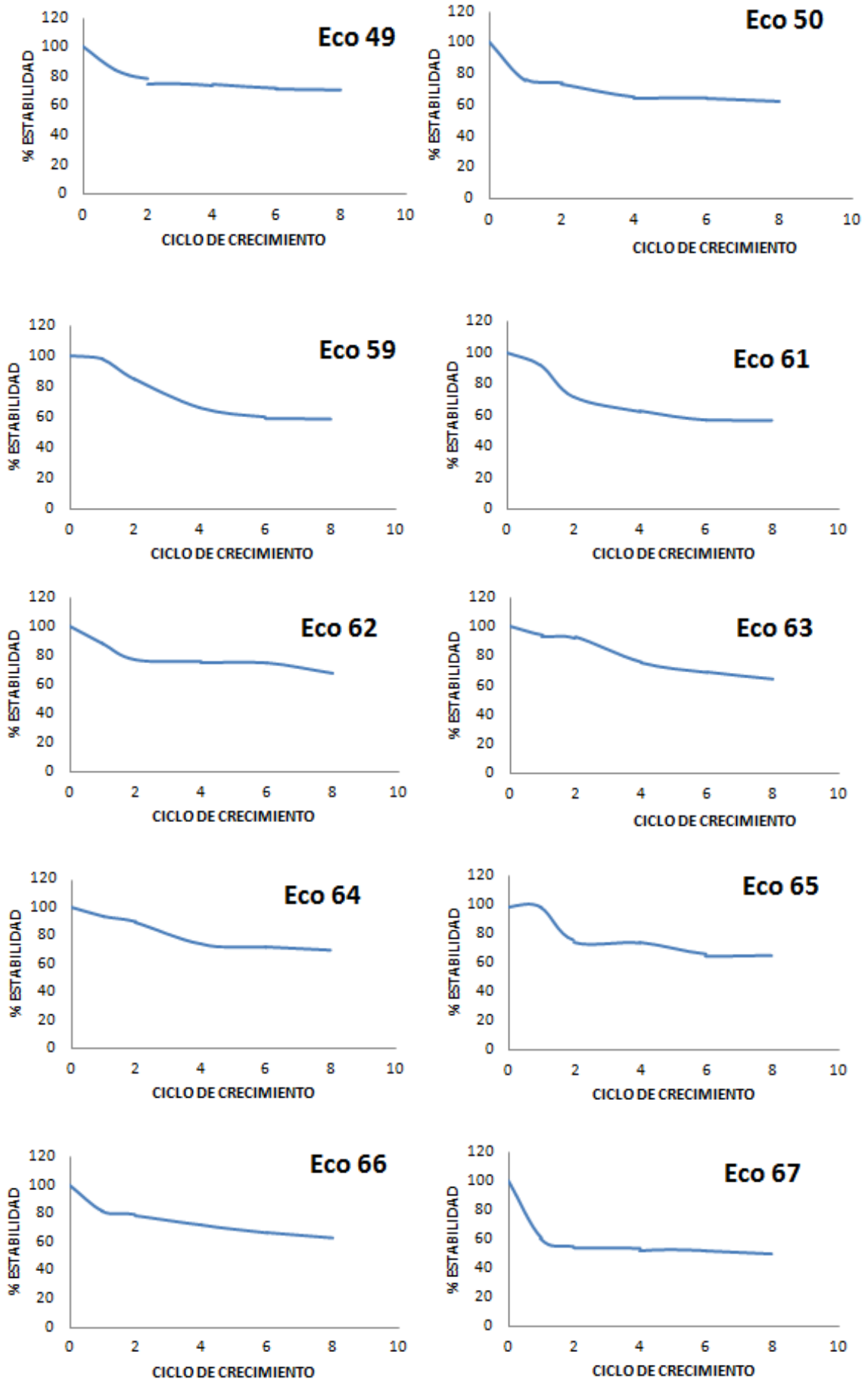
ANEXO IV: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



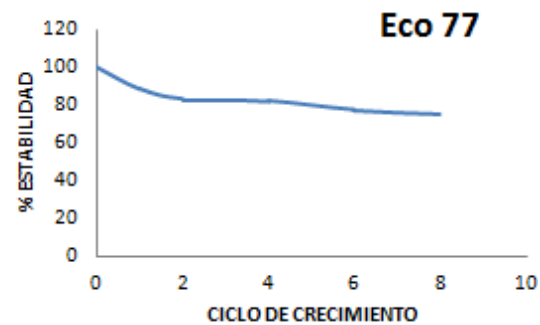
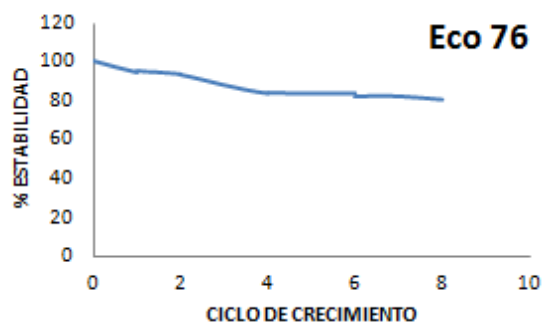
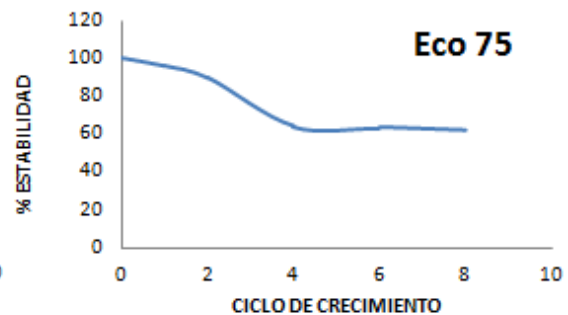
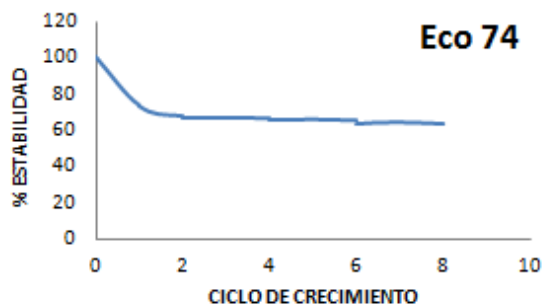
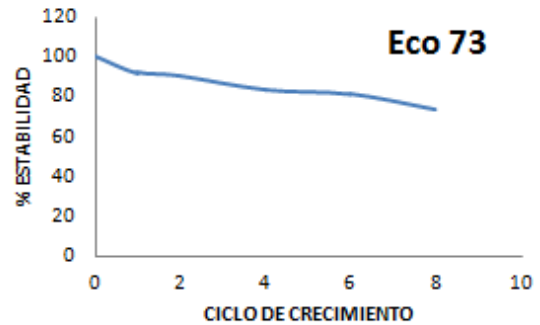
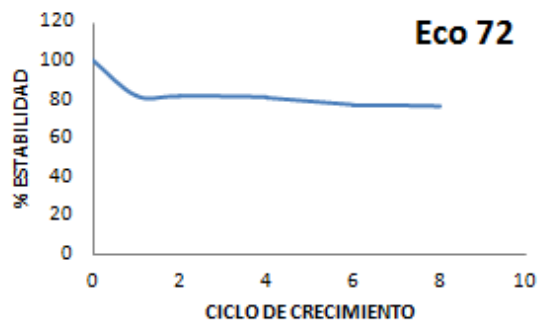
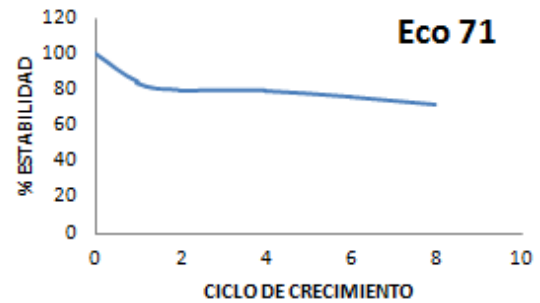
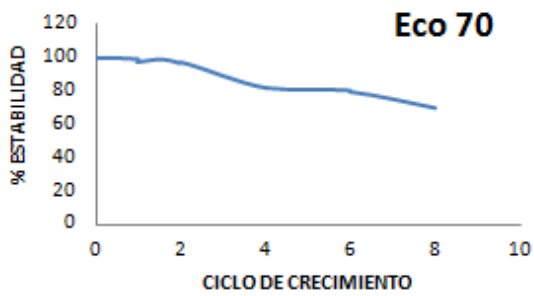
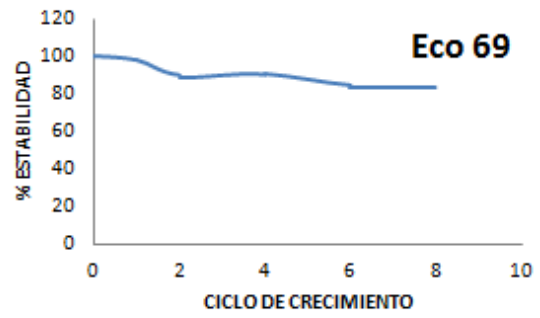
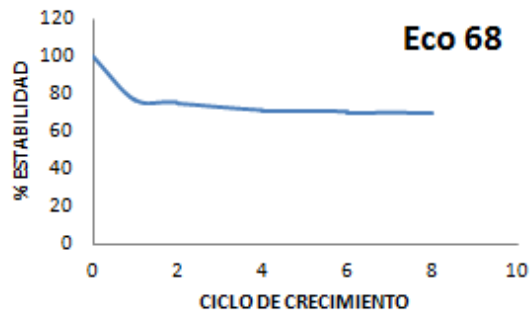
ANEXO IV: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



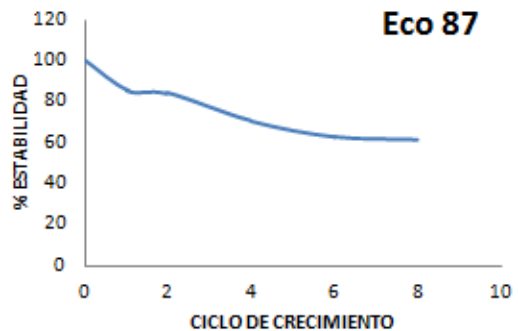
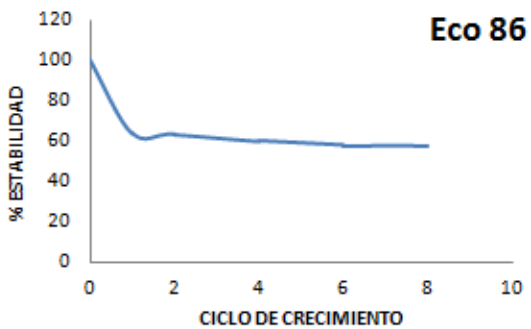
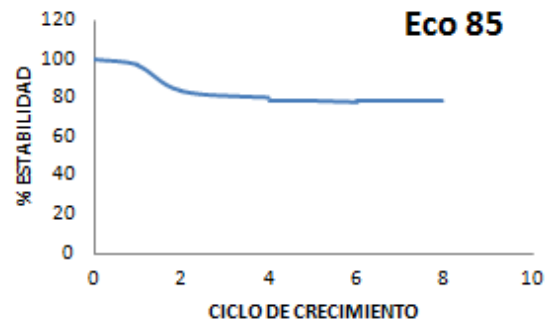
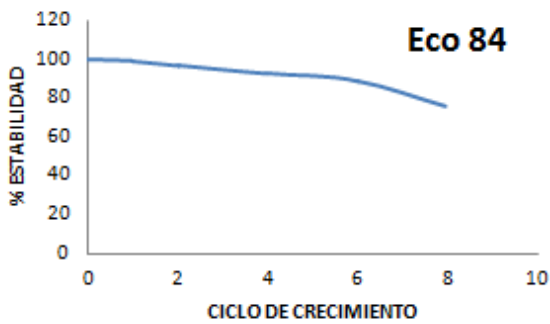
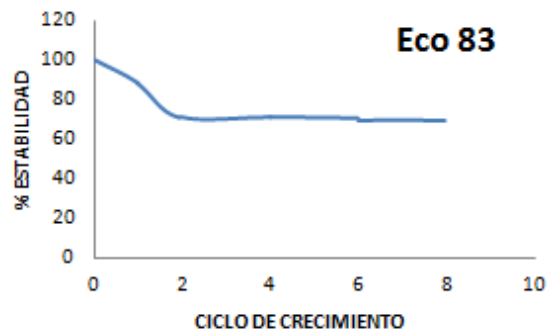
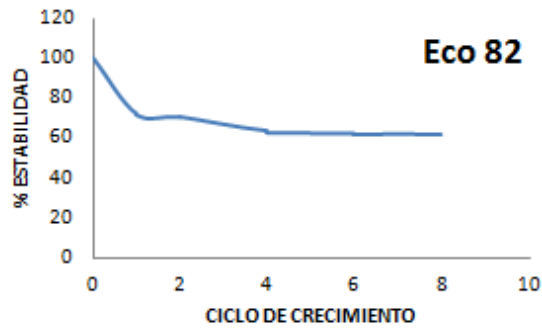
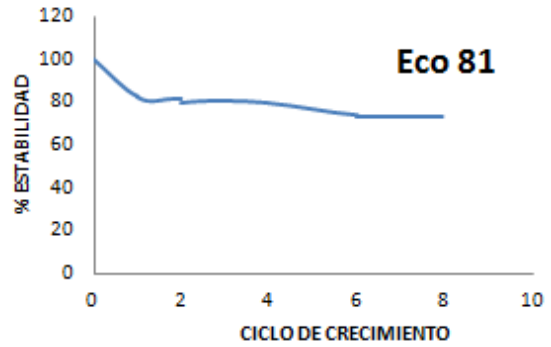
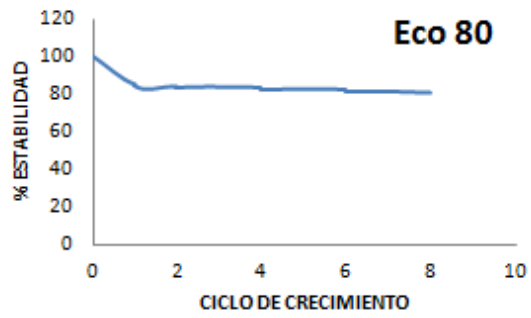
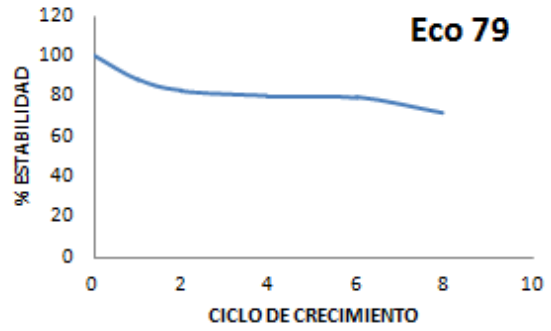
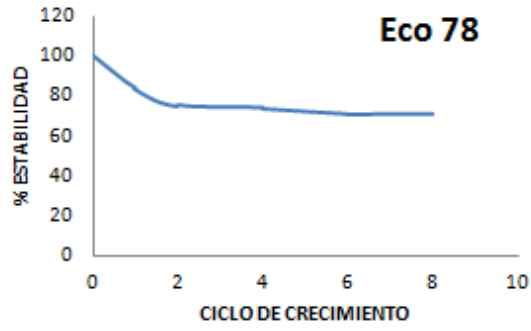
ANEXO IV: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



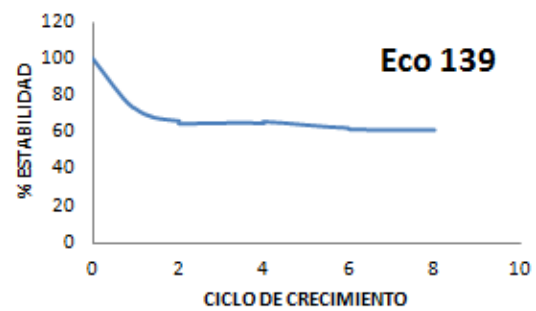
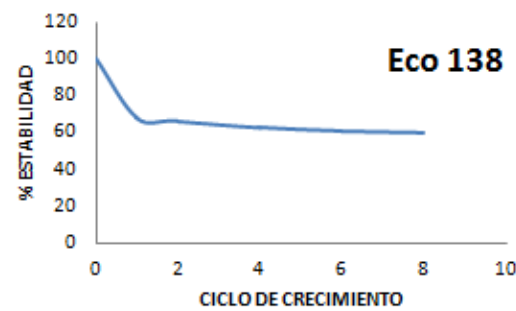
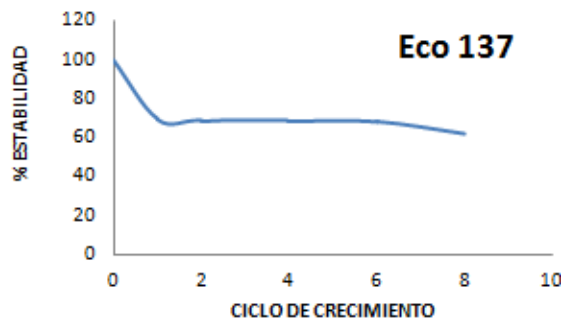
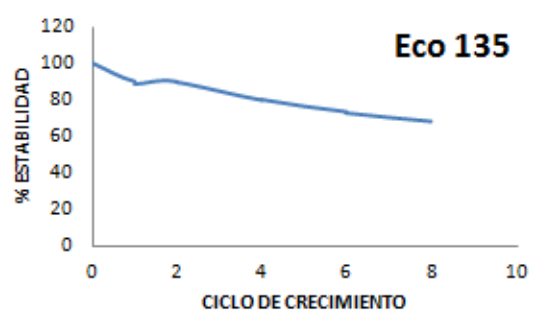
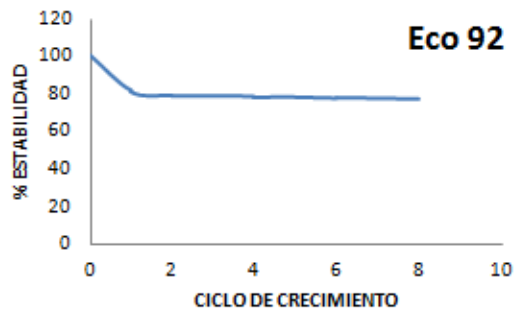
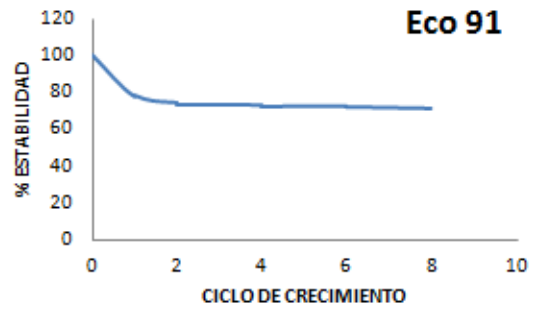
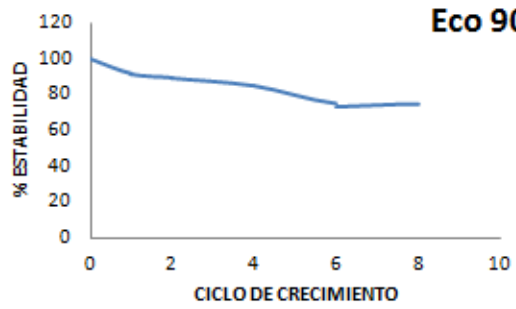
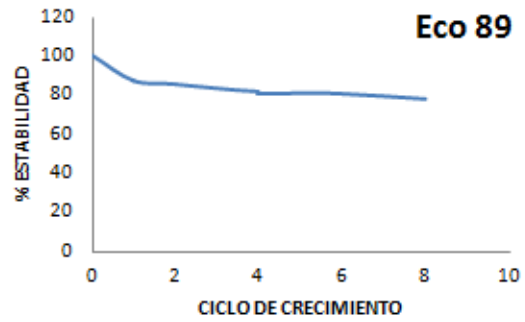
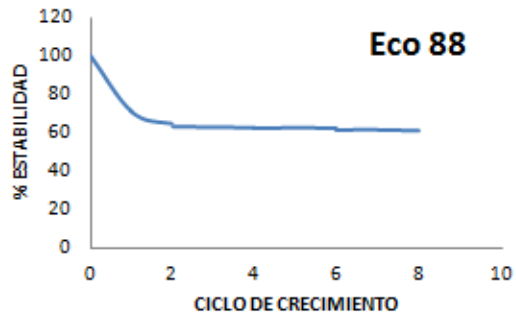
ANEXO IV: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



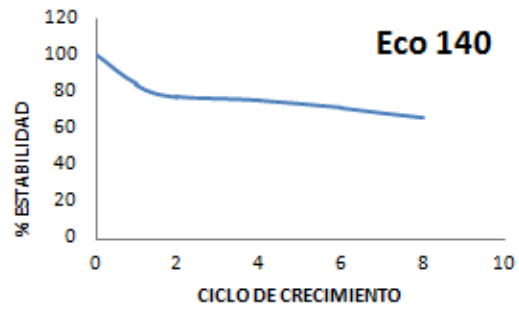
ANEXO IV: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



ANEXO IV: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



ANEXO IV: Estabilidad de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal



Representación gráfica de la estabilidad bacteriana de las cepas de *Escherichia coli* de origen animal tras ocho ciclos de crecimiento bacteriano sin antibiótico presente en el tiempo. Donde cada ciclo de crecimiento está comprendido por un periodo de 12 horas.

ANEXO V: Medicamentos autorizados y comercializados en España que contienen colistina para uso veterinario

NR	Medicamento	PA	Fabricante	E	SA	EC	CU	Especie	Tiempo de Espera
3458 ESP	Colicen 4.000.000 UI/ml	Colistina sulfato	Cenavisa, S.L.	A (12/08/16)	A	C	PV	Terneros, porcino, corderos, pollos y pavos	Carne: 1 día Huevos: 0 días. Su uso no está autorizado en animales cuya leche se utiliza para consumo humano.
3012 ESP	Aquacoli 2.000.000 UI/ml	Colistina sulfato	Laboratorios Calier, S.A.	A (27/03/14)	A	C	PV	Bovino, ovino, porcino y aves de corral	Carne: 1 día Huevos 0 días
2789 ESP	Cotrisul colistina	Colistina sulfato	Jaer, S.A.	A (24/04/13)	A	C	PV	Bovino (terneros), ovino (corderos), porcino (excepto lechones) y aves de corral (excepto pollos de engorde)	Carne: 1 día. Excepto lechones y pollos de engorde Huevos: 0 días.
3451 ESP	Hidrocol 4.000.000 UI/ml solución para administración en agua de bebida y leche	Colistina sulfato	S.P. Veterinaria, S.A.	A (28/07/16)	A	C	PV	Bovino (terneros), ovino (corderos), porcino, pollos y pavos.	Carne: 1 día. Huevos: 0 días Su uso no está autorizado en animales cuya leche se utiliza para consumo humano.
2981 ESP	Colivall 2.000.000 UI/ml solución para administración en agua de bebida o en leche	Colistina sulfato	Mevet, S.A.U	A (10/02/14)	A	C	PV	Terneros, corderos, porcino y aves	Carne: 1 día. Huevos: 0 días
1894 ESP	Coliplus solución	Colistina sulfato	Divasa-Farmavic, S.A.	A (17/07/08)	A	C	PV	Porcino y aves	Carne: 1 día
2986 ESP	Apsasol colistina 3.000.000 UI/ml	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (20/02/14)	A	C	PV	Porcino (lechones destetados)	Ccarne: 0 días.
2547 ESP	Colimutina solución inyectable	Tiamulina hidrógeno fumarato, colistimetato sodio	S.P. Veterinaria, S.A.	A (29/05/12)	A	C	PV	Porcino	Carne: 36 días
855 ESP	Colimicina 635.000 UI/ml solución inyectable	Colistimetato sodio	S.P. Veterinaria, S.A.	A (12/01/94)	A	C	PV	Bovino y porcino	Carne: 32 días Su uso no está A en animales cuya leche se utiliza para consumo humano
2575 ESP	Eupenplus	Amoxicilina trihidrato, Colistina sulfato	Fatro Iberica, S.L.	A (28/04/15)	A	C	PV	Bovino, ovino, porcino y perros	Bovino Carne: 34 días Leche: 4,5 días (108 horas) Porcino: 33 días Ovino Carne: 45 días. Su uso no está A en animales cuya leche se utiliza para el consumo humano
2686 ESP	Potencil	Amoxicilina trihidrato, Colistina sulfato	Virbac España, S.A.	A (13/12/12)	A	C	PV	Porcino, perros y gatos	Carne 33 días.

ANEXO V: Medicamentos autorizados y comercializados en España que contienen colistina para uso veterinario

NR	Medicamento	PA	Fabricante	E	SA	EC	CU	Especie	Tiempo de espera
2630 ESP	Quinocilin	Ampicilina trihidrato, Colistina sulfato	Laboratorios Maymo, S.A.	A (13/09/12)	A	C	PV	Porcino y ovino	Carne: 22 días No administrar a animales en lactación cuya leche se utiliza para consumo humano
1793 ESP	Colivet 2.000.000 UI/ml Concentrado para solución oral par cerdos y aves	Colistina sulfato	Ceva Salud Animal, S.A.	A (06/11/07)	A	C	PV	Porcino y aves	Carne: 1 día Huevos: 0 días
2256 ESP	Colione lamons	Colistina sulfato	Lamons, S.A.	A (03/04/17)	A	C	PV	Porcino	0 días
2220 ESP	Colistina DIVASA 2.000.000 UI/ml Concentrado para solución oral para administración en agua de bebida para bovino, ovino, porcino y pollos.	Colistina sulfato	Divasa-Farmavic, S.A.	A (30/11/10)	A	C	PV	Bovino (terneros), ovino (corderos), porcino y pollos	Carne: 1 día Huevos: 0 días Su uso no está autorizado en animales cuya leche se utiliza para consumo humano
3242 ESP	Colfive 5.000.000 UI/ml Concentrado para solución oral para terneros, porcino, corderos, pollos y pavo.	Colistina sulfato	Livisto Int'L, S.L.	A (07/05/15)	A	C	PV	Porcino, bovino, corderos, pollos y pavos	Carne: 1 día. Huevos: 0 días.
3204 ESP	Pluscolan	Colistina sulfato	Industrial Veterinaria, S.A.	A (25/03/15)	A	C	PV	Bovino (terneros), porcino, ovino (corderos), pollos y pavos	Carne: 1 día Huevos: 0 días.
966 ESP	Colimicina SP 2.050.000 UI/g polvo para administración en agua de bebida	Colistina sulfato	S.P. Veterinaria, S.A.	A (04/11/94)	A	C	PV	Terneros, porcino, pollos y pavos	Carne: Terneros: 14 días Pollos: 2 días Pavos: 0 días Porcino: 0 días Huevos: 0 días
1931 ESP	Colivet 5.000.000 UI/g polvo para administración en agua de bebida para cerdos, aves y terneros.	Colistina sulfato	Ceva Salud Animal, S.A.	A (09/10/08)	A	C	PV	Bovino (terneros), Porcino, Aves (pollos de engorde y gallinas ponedoras)	Carne: Terneros: 2 días. Cerdos: 1 día Pollos de engorde: 2 días Huevos: 0 días
647 ESP	Colistop polvo para administración en agua de bebida	Colistina sulfato	Super'S Diana, S.L	A (19/01/93)	A	C	PV	Porcino y bovino	1 día
2435 ESP	Apsasol colistina 22.500.000 UI/g polvo para administración en agua de bebida	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (19/01/12)	A	C	PV	Porcino	0 días
1885 ESP	Acolan	Colistina sulfato	Industrial Veterinaria, S.A.	A (03/06/08)	A	C	PV	Porcino	1 día
2181 ESP	Apsasol colistina 3.000.000 UI/g	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (23/08/10)	A	C	PV	Porcino (lechones destetados)	0 días

ANEXO V: Medicamentos autorizados y comercializados en España que contienen colistina para uso veterinario

NR	Medicamento	PA	Fabricante	E	SA	EC	CU	Especie	Tiempo de espera
1214 ESP	Nipoxyme soluble 100	Colistina sulfato	Andersen, S.A.	A (22/06/98)	A	C	PV	Bovino (terneros), porcino y aves de corral	Carne: 1 día Huevos: 0 días
3400 ESP	Colymixe 22,5 MUI/g polvo para administración en agua de bebida	Colistina sulfato	Andersen, S.A.	A (11/05/16)	A	C	PV	Bovino (terneros), porcino, pollos y pavos	Carne: 1 día Huevos: 0 días
1985 ESP	Nipoxyme 22.500.000 UI/g polvo para administración en el agua de bebida	Colistina sulfato	Andersen, S.A.	A (17/02/09)	A	C	PV	Porcino	1 día
811 ESP	Colisol	Colistina sulfato	Laboratorios Maymo, S.A.	A (29/09/93)	A	C	PV	Terneros, porcino, pollos y pavos.	Carne: 1 día. Huevos: 0 días.
991 ESP	Ganamix colistina 1.200.000 UI/g premezcla medicamentosa	Colistina sulfato	Laboratorios Calier, S.A.	A (13/02/95)	A	C	PV	Porcino, aves (pollos) y conejos.	Carne: Pollos y conejos: 7 días. Porcino: 0 días. No usar en aves ponedoras cuyos huevos se utilizan para el consumo humano
1177 ESP	Colipremix 40	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (22/09/97)	A	C	PV	Porcino y aves	Carne de cerdos y aves: 7 días.
2927 ESP	Ganamix colistina 15.000.000 UI/g Premezcla medicamentosa	Colistina sulfato	Laboratorios Calier, S.A.	A (28/11/13)	A	C	PV	Porcino	Carne: 0 días.
2492 ESP	Colimix 3.000.000 UI/g	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (21/03/12)	A	C	PV	Porcino (lechones y cerdos de engorde) y conejos	Carne: 0 días
1654 ESP	Colitrax 40 mg/g	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (11/10/05)	A	C	PV	Porcino	0 días
1655 ESP	Apsamix colistina 40 mg/g premezcla medicamentosa para porcino	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (11/10/05)	A	C	PV	Cerdo	0 días
2070 ESP	Colimix1.200.000 UI/g premezcla medicamentosa	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (29/09/09)	A	C	PV	Porcino y conejos	0 días
1117 ESP	Nipoxyme 100	Colistina sulfato	Andersen, S.A.	A (01/10/96)	A	C	PV	Porcino y conejos	Carne: 0 días
3160 ESP	Apsasol colistina 22.500.000 UI/g premezcla medicamentosa	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (15/01/15)	A	C	PV	Porcino	0 días
3525 ESP	Apsaliq colistina 3.000.000 UI/ml solución para administración en agua de bebida y leche para porcino, bovino, ovino, pollos y pavos	Colistina sulfato	Andres Pinaluba, S.A.	A (22/02/17)	A	C	PV	Porcino, bovino, ovino, pollos y pavos	1 día

Resumen de los medicamentos autorizados y comercializados en España que contienen colistina para uso en medicina veterinaria. Donde: NR: número de registro; Medicamento: nombre del producto; PA: principio activo; E: Estado; SA: Situación administrativa; EC: Estado de comercialización; CU: condiciones de prescripción y uso; A: autorizado; C: comercializado; PV: Sujeto a prescripción veterinaria.

ANEXO VI: Compendio de artículos

En este anexo se recogen los artículos publicados durante el proceso de elaboración de esta tesis doctoral:

Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, Campos MJ, García M, Píriz S, Sáez JL, Domínguez L (2016). Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Res Vet Sci.* 105: 134-135.

Hernández M, Iglesias MR, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Quijada N, Miguela-Villoldo P, Campos MJ, Píriz S, López-Orozco G, de Frutos C, Sáez JL, Ugarte-Ruiz M, Domínguez L, Quesada A (2017). Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. *Euro Surveill.* 2017 Aug 3;22(31).

Sánchez-Benito R, Iglesias MR, Quijada NM, Campos MJ, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Pazos C, Rodríguez-Lázaro D, Garduño E, Domínguez L, Quesada A (2017). *Escherichia coli* ST167 carrying plasmid mobilizable *mcr-1* and *blaCTX-M-15* resistance determinants isolated from a human respiratory infection. *Int J Antimicrob Agents.* 50:285-286.



Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain



Alberto Quesada ^{a,*}, María Ugarte-Ruiz ^b, M. Rocío Iglesias ^{a,e}, M. Concepción Porrero ^b, Remigio Martínez ^{c,e}, Diego Florez-Cuadrado ^b, María J. Campos ^d, María García ^b, Segundo Píriz ^e, José Luis Sáez ^f, Lucas Domínguez ^b

^a Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Spain

^b VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense Madrid, Avda Puerta Hierro, s/n, 28040, Madrid, Spain

^c Red de Grupos de Investigación en Recursos Faunísticos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Spain

^d MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, ESTM, Instituto Politécnico de Leiria, 2520-641 Peniche, Portugal

^e Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Spain

^f Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2015

Received in revised form 22 January 2016

Accepted 5 February 2016

Keywords:

Colistin resistance

mcr-1

PmrAB

Plasmid

S. enterica

E. coli

ABSTRACT

Recent findings suggest that use of colistin as a last resort antibiotic is seriously threatened by the rise of a new plasmid mediated mechanism of resistance (MCR-1). This work identifies, for the first time in Southern Europe, the gene *mcr-1* in nine strains from farm animals (poultry and swine) corresponding to five *Escherichia coli* and four *Salmonella enterica*, among which three belong to serovar Typhimurium and one to Rissen. The MCR-1 was found encoded by a plasmid highly mobilizable by conjugation to the *E. coli* J53 strain. Two *E. coli* strains carried two determinants, *mcr-1* plus *pmrA* or *pmrB* mutations, known to confer colistin resistance.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The raise in bacterial resistance against antimicrobials like carbapenems, cephalosporins and fluoroquinolones, widely used to control infections in humans by Gram negative microorganisms, have brought back colistin (polymixin E) to the therapeutic arsenal as a last resort antibiotic (Landman et al., 2008). The effectiveness of colistin treatments is sustained by the extremely rare existence of resistant bacteria, which determinants were believed to reduce bacterial fitness and lacking horizontal transmission mechanisms (Kempf et al., 2013). Colistin resistance is mediated by the enhanced expression of enzyme activities that covalently modify the bacterial lipopolysaccharide (LPS), reducing its negative charge and the binding of positive cations like polymixins (Sun et al., 2009). According to the theoretical low risk of selection and spreading of colistin resistance, this antimicrobial is routinely used for treatments of farm animals, like swine and poultry (Kempf et al., 2013). However, a novel colistin resistance mechanism named MCR-1, consisting in ectopic expression of ethanolamine transferase activity conferred by a plasmid that is easily mobilized among bacteria, has been recently discovered in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas* spp. in China (Liu et al., 2015). Following that work, different studies have described the presence of the *mcr-1* gene in

enterobacteria of human, animal and food origin, (Arcilla et al., 2016; Falgenhauer et al., 2016; Hasman et al., 2015; Suzuki et al., 2016; Webb et al., 2016).

Our previous work identified six colistin-resistant bacterial strains in swine: three *Salmonella enterica* from lymph node (isolated in 2010 and 2011) plus one from feces (isolated in 2009) and two *E. coli* from feces (isolated in 2010 and 2011; Quesada et al., 2015). Among them, only the two *E. coli* strains carried mutations known to confer colistin resistance by increasing the activity of the PmrAB two-component system, which control the expression of enzymes that modify the bacterial LPS (Sun et al., 2009). Also, in the context of the Spanish Surveillance Network of Antimicrobial Resistance in Bacteria of Veterinary Origin (VAV Network, VISAVET), three additional colistin-resistant *E. coli* strains isolated from turkey feces in 2014 have been included in the current study to span the isolates origin to two different animal hosts, swine and poultry (Table 1). Remarkably, all the nine strains expressing colistin resistance presented the *mcr-1* gene that was detected by the PCR described previously (Liu et al., 2015). Considering the global number of samples analyzed, the *mcr-1* gene was screened and detected in all the nine bacterial strains presenting colistin resistance, three isolated from 122 lymph nodes, three from 439 swine faecal samples and three from 170 turkey faecal samples. In the case of lymph node, each sample corresponded to one animal belonging to one

* Corresponding author.

E-mail address: aquesada@unex.es (A. Quesada).

Table 1

Phenotypes and molecular analysis of colistin resistant enterobacteria from farm animals.

Strain	Species	Origin	M ^a	m ^b	P ^c	p ^d	Mob ^e
ZTA14/01057	<i>E. coli</i>	Turkey feces	4	+	+	–	+(3.4 × 10 ⁻²)
ZTA11/01748	<i>E. coli</i>	Swine feces	8	+	+	+	–
ZTA13/02182	<i>E. coli</i>	Swine feces	4	+	+	+	–
ZTA14/00979	<i>E. coli</i>	Turkey feces	4	+	+	–	+(2.6 × 10 ⁻¹)
ZTA14/00590	<i>E. coli</i>	Turkey feces	4	+	+	–	+(5.1 × 10 ⁻²)
ZTA09/00762	<i>S. typhimurium</i>	Swine feces	8	+	+	–	+(1.2 × 10 ⁻²)
ZTA10/00723	<i>S. typhimurium</i>	Swine lymph node	8	+	+	–	+(1.7 × 10 ⁻²)
ZTA10/00996	<i>S. rissen</i>	Swine lymph node	8	+	+	–	+(3.8 × 10 ⁻¹)
ZTA11/01078	<i>S. typhimurium</i>	Swine lymph node	8	+	+	–	+(8.1 × 10 ⁻¹)

^a Minimal inhibitory concentration (MIC) of colistin (mg/L) was determined by the 2-fold broth microdilution reference method according to ISO 20776-1:2006. The threshold of antimicrobial resistance adopted in this work was based on the epidemiological cut-off (ECOFF) values recommended by EUCAST (<http://www.eucast.org>).

^b *mcr-1* detection by PCR; primers and conditions used as previously described (4); + symbolizes a clear amplification of the 309 bp PCR product, which was purified and sequenced, showing total identity with *mcr-1* from *E. coli* strain SHP45 plasmid pHNSHP45 (GenBank KP347127.1).

^c Plasmids carrying *mcr-1* were detected by pulse field gel electrophoresis of total DNA, following the standard protocol from PulseNet for *E. coli* and *Salmonella* (www.cdc.gov), after the lysis of cells and treatment with nuclease S1 "in plugs" according to the manufacturer's instructions (Invitrogen), transfer to a nylon membrane and hybridization to a digoxigenin-labelled *mcr-1* probe (Roche) and detection of signals (+) between the 55 and 78 kb bands of *S. Braenderup* digested with *Xba*I used as the molecular weight marker.

^d *pmrA* and *pmrB* genes were PCR amplified, sequenced and polymorphisms identified as previously described (Quesada et al., 2015).

^e Mobilization of plasmids was assayed by mating donor cells with *E. coli* J53 strain and selecting conjugants in 200 mg/L sodium azide and 2 mg/L colistin; +, colonies observed on double selective medium; –, no growth on double selective medium; conjugation efficiency (between parentheses) was calculated, when determined, as the relation between conjugants and donor cells; all sequencing reactions were performed in the facilities of STAB, University of Extremadura.

farm ($n = 122$), but regarding faecal samples, pooled samples per farm were processed and ten different animals make up a sample for turkey ($n = 1700$) and two different animals for swine ($n = 878$).

The sequence of *mcr-1* gene was found in every strain in plasmids of similar size, as was determined by PFGE of genetic material digested by S1 nuclease and hybridized to a *mcr-1* probe (Table 1). The identified plasmids, of around 50–70 kb, similar to the mobilizable element that carries *mcr-1* and confers colistin resistance in Gram negative organisms detected in China (Liu et al., 2015). Supporting this result, the genetic elements found were shown to be efficiently mobilized by conjugation in the majority of strains, with efficiencies in the range of 10⁻¹ to 10⁻² (Table 1). Interestingly, the two *E. coli* strains that carried mutations in PmrAB that confer colistin resistance (Sun et al., 2009; Quesada et al., 2015) did not transfer the phenotype by conjugation.

This work describes, for the first time and to our knowledge, the identification of MCR-1 in enterobacteria and particularly *S. enterica* from farm animals in Southern Europe, a finding that is suggestive of a worldwide distribution of this plasmidic element, threatening the use of colistin as a last resort antibiotic. Further studies will be necessary to determine the genetic environment of the *mcr-1* gene in our isolates, to relate it with elements isolated from different regions.

Acknowledgments

This work has been supported by the Ministry of Innovation, Science and Technology of Spain (AGL2012-39028-C03-01 and AGL2012-39028-C03-03), the Department of Employ, Enterprise and Innovation of the Regional Government of Extremadura, Spain (Group CTS001), the University of Extremadura (Group MIVET), and the Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment and the Autonomous Community of Madrid, Spain (S2013/ABI-2747). M.R.I. and D.F.-C. wish to thank, for their respective PhD fellowships, the "Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno" and to the FPI programme (BES-2013-065003) of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

References

- Arcilla, M.S., van Hattem, J.M., Matamoros, S., Melles, D.C., Penders, J., de Jong, M.D., Schultzs, C., COMBAT consortium, 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00541-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1) (in press).
- Falgenhauer, L., Waezsada, S.-E., Yancheng, Y., Imirzalioglu, C., Käsbohrer, A., Roessler, U., Michael, G.B., Schwarz, S., Werner, G., Kreienbrock, L., Chakraborty, T., RESET consortium, 2016. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00009-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00009-8) (in press).
- Hasman, H., Hammerum, A., Hansen, F., Hendriksen, R., Olesen, B., Agersø, Y., Zankari, E., Leekitcharoenphon, P., Stegger, M., Kaas, R., Cavaco, L., Hansen, D., Aarestrup, F., Skov, R., 2015. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark. *Eurosurveillance* <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085> (in press).
- Kempf, I., Fleury, M.A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec, J.Y., Jouy, E., 2013. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 379–383.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D.A., Quale, J., 2008. Polymyxins revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 449–465.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J., 2015. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7) (in press).
- Quesada, A., Porrero, M.C., Téllez, S., Palomo, G., García, M., Domínguez, L., 2015. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 71–74.
- Sun, S., Negrea, A., Rhen, M., Andersson, D.I., 2009. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2298–2305.
- Suzuki, S., Ohnishi, M., Kawanishi, M., Akiba, M., Kuroda, M., 2016. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00008-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00008-6) (in press).
- Webb, H.E., Granier, Sophie A., Marault, M., Millemann, Y., den Bakker, H.C., Nightingale, K.K., Bugarel, M., Ison, S.A., Scott, H.M., Loneragan, G.H., 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00538-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00538-1) (in press).

Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015

M Hernández^{1,2,3}, MR Iglesias^{3,4}, D Rodríguez-Lázaro^{3,5}, A Gallardo⁴, NM Quijada¹, P Miguela-Villoldo⁶, MJ Campos⁷, S Píriz⁸, G López-Orozco⁹, C de Frutos¹⁰, JL Sáez⁹, M Ugarte-Ruiz⁶, L Domínguez^{6,11}, A Quesada^{4,12}

1. Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain

2. Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, Tecnología de los Alimentos, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid, Palencia, Spain

3. These authors contributed equally to the manuscript

4. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

5. Área de Microbiología, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Burgos, Burgos, Spain

6. VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain

7. MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, Instituto Politécnico de Leiria, Peniche, Portugal

8. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

9. Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, Spain

10. Laboratorio Central de Veterinaria, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Algete, Spain

11. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

12. INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

Correspondence: María Ugarte-Ruiz (maria.ugarte@visavet.ucm.es)

Citation style for this article:

Hernández M, Iglesias MR, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Quijada NM, Miguela-Villoldo P, Campos MJ, Píriz S, López-Orozco G, de Frutos C, Sáez JL, Ugarte-Ruiz M, Domínguez L, Quesada A. Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. Euro Surveill. 2017;22(31):pii=30586. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30586>

Article submitted on 20 July 2017 / accepted on 02 August 2017 / published on 03 August 2017

Colistin resistance genes *mcr-3* and *mcr-1* have been detected in an *Escherichia coli* isolate from cattle faeces in a Spanish slaughterhouse in 2015. The sequences of both genes hybridised to same plasmid band of ca 250 kb, although colistin resistance was non-mobilisable. The isolate was producing extended-spectrum beta-lactamases and belonged to serotype O9:H10 and sequence type ST533. Here we report an *mcr-3* gene detected in Europe following earlier reports from Asia and the United States.

Very recently, in June 2017, Yin et al. detected a third mobile colistin resistance gene *mcr-3* on an IncHI2-type plasmid, pWJ1, in a porcine *E. coli* isolate from Malaysia [1]. The authors also identified similar elements in a shotgun genome sequence of a human *Klebsiella pneumoniae* isolate from Thailand and a human *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolate from the United States [1].

We found an *Escherichia coli* isolate carrying the *mcr-3* gene among other isolates expressing colistin resistance. It was sampled in cattle faeces at the time of slaughter in Spain in September 2015. The aim of this paper is to describe the presence of *mcr-3* in Europe in a strain also carrying the *mcr-1* gene.

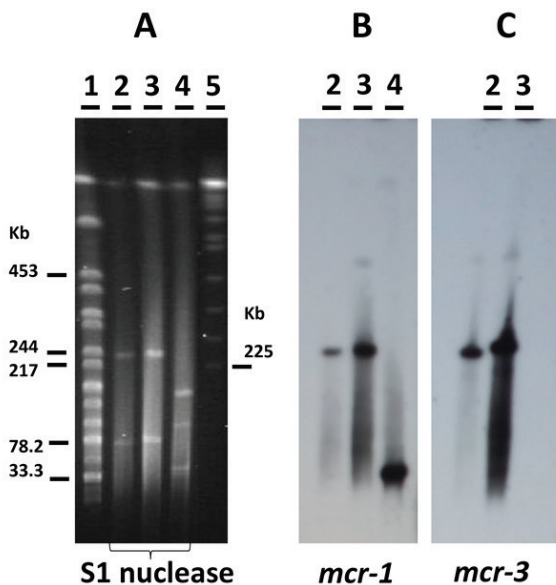
Screening of bovine samples for colistin-resistant bacteria

The VISAVET Health Surveillance Centre in Madrid has been carrying out the national surveillance for detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria in food-producing animals since 2014, commissioned by the Spanish Ministry of Agriculture and Fishing, Food and Environment according to Commission Implementing Decision 2013/652/EU [2]. The screening was performed at slaughterhouses during 2015 on healthy cattle younger than one year from 318 farms (caecal content of 636 animals). The procedure followed the EURL-AR recommendations for detecting ESBL-producing *E. coli* [3].

A total of 152 samples (47.8%) were suspected to be positive, so antimicrobial susceptibility testing was performed by Sensititre microbroth dilution using EUVSEC and EUVSEC2 plates (Trek Diagnostic Systems, US) to confirm their beta-lactamase production. The antimicrobial drugs to be included in each panel are detailed in the Commission Implementing Decision 2013/652/EU [2]. Six *E. coli* isolates were found resistant to colistin and further characterised. Among them, five were PCR-positive for *mcr-1* [4] and one isolate (ZTA15/01169-1EB1) was also PCR-positive for *mcr-3* [1]. All isolates presented multi-resistant phenotypes (Table 1) and lacked the *mcr-2* gene [5].

FIGURE

S1 nuclease mapping of *mcr-1* and *mcr-3.2* genes in *Escherichia coli* ZTA15/01169-1EB1, Spain, September 2015



A. PFGE was performed in a Bio-Rad CHEF-DR11 electrophoresis system, and agarose plugs were prepared according to manufacturer instructions. *Xba*I and S1 nuclease treatments were performed as previously described [17]. Lane 1: *Xba*I-digested *Salmonella* Braenderup; Lanes 2 and 3: S1 nuclease-digested *E. coli* ZTA15/01169 at 1x (108 cells/mL plug) and 3x concentration, respectively; Lane 4: S1 nuclease-digested *E. coli* HSP38 (carrying *mcr-1* by IncX4 plasmid) [15]; Lane 5: *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes as a second molecular weight marker (Bio-Rad, US).

B. Southern hybridisation to Dig-labelled probes (Sigma, US) from *mcr-1* sequences.

C. Southern hybridisation to Dig-labelled probes (Sigma, US) from *mcr-3* sequences.

Both *mcr-1* and *mcr-3* genes were detected by PCR using previously described primers and conditions [1,4]. Minimal inhibitory concentrations were determined by using the two-fold broth microdilution reference method according to ISO 20776-1:2006 [6]. The interpretation of the quantitative data was performed as described by the Commission Implementing Decision 2013/652/EU [2], EURL-AR (the EU Reference Laboratory for antimicrobial resistance in the context of animal health and food safety) and The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [7].

The isolate ZTA15/01169-1EB1 carrying both *mcr-1* and *mcr-3* was resistant to most antimicrobial drugs analysed, including ampicillin, azithromycin, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, gentamicin, nalidixic acid, sulfamethoxazole, tetracycline and trimethoprim. The isolate was

sensitive to carbapenems, ceftazidime, temocillin and tigecyclin (Table 1).

Characterisation of the *mcr-1* and *mcr-3* *Escherichia coli* isolate

DNA from isolate ZTA15/01169-1EB1 was extracted with the QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit and sequencing libraries were prepared using the Nextera XT kit and sequenced on a MiSeq (Illumina) using v3 reagents with 2 x 300 cycles. This isolate produced 547,226 reads that were assembled using SPAdes v 3.9.0 [8]. The draft genome of 5,115,727 bp was composed by 495 contigs ($N_{50} = 23,843$, 29X coverage) and genome annotation was performed by using Prokka [9]. The profiles of serotype O9:H10, ST533, rST 30316, cgST 47043 and wgST 49795 were predicted by using Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>). The resistome of the draft genome was analysed by blastn [10] searches against the ResFinder database [11]. The presence of putative plasmids was evaluated by blastn searches against the PlasmidFinder database, revealing 100% identity to sequence probes from IncHI2 and IncI1 replicons (Table 2) [12]. Both colistin resistance genes carried by isolate ZTA15/01169-1EB1, *mcr-1* and *mcr-3*, are plasmidic and have been associated with IncHI2 plasmids [1,13].

mcr-1 was found in a 2,074 bp-length contig, and blastn comparison against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database [14] revealed best match with the IncHI2-type plasmid pECJS-59-244 previously described [13]. *mcr-3* was found in a 4,098 bp-length contig, and blastn of the gene showed 100% coverage (1-1626/1626) and 99.94% nucleotide identity to *mcr-3*. A unique polymorphism (C1463T) was found in its coding sequence, giving rise to a T488I variant of the protein encoded by this gene allele, hereafter named *mcr-3.2*. Moreover, isolate ZTA15/01169-1EB1 contained the mutations S83L and D87N of *GyrA*, in complete concordance with the phenotypic results (Table 1), in addition to two beta-lactamase-encoding genes (*bla*CTX-M-55 and *bla*TEM-1) and several other resistance determinants (Table 2). CTX-M is a widely spread ESBL that could be encoded by IncHI2 and IncI1, among other plasmids [13].

Plasmid location of the *mcr-1* and *mcr-3.2* genes from isolate ZTA15/01169-1EB1 was evidenced by nuclease S1 digestion and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), followed by transfer of DNA to nylon membranes and hybridisation to Dig-labelled probes (Sigma, US). Specific signals obtained by using probes for both *mcr-1* and *mcr-3*, matched a plasmid band of ca 250 kb (Figure). Specificity of the *mcr-1* probe was evidenced by using a previously characterised strain carrying *mcr-1* on a 30 kb IncX4 plasmid [15]. A second ca 75 kb plasmid was identified by PFGE in isolate ZTA15/01169-1EB1 (Figure). However, despite the plasmidic location of the *mcr-1* and *mcr-3.2* genes, colistin resistance was not mobilisable by conjugation in standard conditions (overnight mating at 37°C) to the receptor strain *E. coli*

TABLE 1

Colistin resistance genes and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates of bovine origin, Spain, September 2015 (n = 6)

	ZTA15/ 01169-1EB1	ZTA15/ 00213-1EB1	ZTA15/ 00579-1EB1	ZTA15/ 01425-1EB1	ZTA15/ 01928-1EB1	ZTA15/ 02163-1EB1
Presence of <i>mcr</i> gene						
<i>mcr-1</i>	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>mcr-3</i>	Yes	No	No	No	No	No
Antimicrobial resistance (minimal inhibitory concentrations)						
COL	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)
CIP	>8 (R)	8 (R)	>8 (R)	>8 (R)	8 (R)	8 (R)
NAL	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)
AMP	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)
FEP	>32 (R)	4 (R)	>32 (R)	16 (R)	>32 (R)	16 (R)
FOT	>4 (R)	>4 (R)	>4 (R)	>4 (R)	>4 (R)	>4 (R)
FOT2	>64 (R)	16 (R)	>64 (R)	64 (R)	>64 (R)	>64 (R)
FOX	4	16 (R)	8	8	4	4
TAZ	>8 (R)	>8 (R)	8 (R)	4 (R)	8 (R)	8 (R)
TAZ2	8 (R)	128 (R)	16 (R)	4 (R)	8 (R)	8 (R)
TRM	16	16	8	8	8	≤4
ETP	0.03	≤0.015	0.03	0.03	0.06	0.03
IMI	≤0.12	≤0.12	≤0.12	0.25	0.25	0.25
MER	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03
MER2	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03
AZI	64 (R)	64 (R)	8	4	≤2	≤2
CHL	>128 (R)	128 (R)	128 (R)	32 (R)	8	128 (R)
GEN	>32 (R)	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
TET	>64 (R)	64 (R)	32 (R)	>64 (R)	64 (R)	>64 (R)
SMX	>1,024 (R)	>1,024 (R)	>1,024 (R)	>1,024 (R)	>1,024 (R)	>1,024 (R)
TMP	>32 (R)	0.5	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)
TGC	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25

AMP: ampicillin; AZI: azithromycin; CHL: chloramphenicol; CIP: ciprofloxacin; COL: Colistin; ETP: ertapenem; FEP: Cefepime; FOT/FOT2: cefotaxime; FOX: ceftazidime; GEN: gentamicin; IMI: imipenem; MER/MER2: meropenem; NAL: nalidixic acid; SMX: sulfamethoxazole; TAZ/TAZ2: ceftazidime; TET: tetracycline; TGC: tigecyclin; TMP: trimethoprim; TRM: temocillin.

Antibiotics are ordered according to importance/clinical impact in food-producing animals.

Resistance is indicated by (R).

mcr-1 and *mcr-3* genes were detected by PCR using previously described primers and conditions [1,4]. Minimal inhibitory concentrations were determined by using the two-fold broth microdilution reference method according to ISO 20776-1:2006 [6]. The interpretation of the quantitative data was performed as described by the Commission Implementing Decision 2013/652/EU [2], EUURL-AR (EU Reference Laboratory for antimicrobial resistance in the context of animal health and food safety) and EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [7].

J53 after selection in medium with sodium azide (100 mg/L) and colistin (2 mg/L). The previously described *E. coli* isolate ZTA14/01057 was used as a positive control in parallel, and conjugation to the same recipient was successful with $4.2 \cdot 10^{-2}$ efficiency [16].

Discussion and conclusions

The first plasmid-mediated polymyxin resistance mechanism, *mcr-1*, was reported in 2016 by Liu et al. in human *E. coli* and *K. pneumoniae* collected from five provinces in China between April 2011, and November 2014 [4]. A second resistance gene, *mcr-2*, was identified in porcine and bovine *E. coli* in Belgium in June 2016 [5], and as recently as in June 2017, Yin et al. reported the finding of the third gene, *mcr-3*, in a porcine *E. coli* isolate from Malaysia and two humans isolates of *K.*

pneumoniae and *S. enterica* serovar Typhimurium from Thailand and the United States, respectively [1]. We also demonstrated in 2016 the presence of *mcr-1* in *E. coli* and *S. enterica* isolates from poultry and swine in Spain [15]. In addition to these findings, this work describes the results of screening for multidrug-resistant *E. coli* (including polymyxin resistance) of bovine origin in Spain. Among the colistin-resistant isolates found, three genotypes were identified: strains carrying *mcr-1* alone, strains carrying *mcr-1* and *mcr-3.2*, and strains without any plasmidic determinants. This study shows the appearance of the colistin-resistant *mcr-3* gene in Europe as early as in 2015, as well as the coexistence of two plasmid-mediated colistin resistance genes, *mcr-1* and *mcr-3.2* in the same cells of isolate ZTA15/01169-1EB1.

TABLE 2

Resistome and plasmid profiles of *Escherichia coli* ZTA15/01169–1EB1, Spain, September 2015

Sequences	Coverage ^a	Identity (%)	AN ^b
<i>aac(3)-lid</i>	1–861/861	99.884	EU022314
<i>aadA1</i>	1–972/972	97.428	X02340
<i>aadA2</i>	1–792/792	99.747	JQ364967
<i>blaCTX-M-55</i>	1–876/876	100	GQ456159
<i>blaTEM-1A</i>	1–854/861	100	HM749966
<i>dfrA1</i>	1–474/474	100	JQ690541
<i>floR</i>	1–1214/1215	98.188	AF118107
<i>mcr-1</i>	1–1626/1626	100	KP347127
<i>mcr-3</i>	1–1626/1626	99.94	KY924928
<i>mph(A)_1</i>	1–906/906	100	D16251
<i>mph(A)_2</i>	1–921/921	99.675	U36578
<i>strA</i>	1–804/804	100	M96392
<i>strB</i>	1–837/837	100	M96392
<i>sul1</i>	1–927/927	100	CP002151
<i>sul3</i>	1–792/792	100	AJ459418
<i>tet(A)</i>	1–1200/1200	100	AJ517790
IncHI2 (<i>repHI2</i>)	1–327/327	100	BX664015
Incl1_1_Alpha (RNAI-1)	1–142/142	100	AP005147

Resistance and plasmid determinants were identified against the ResFinder and PlasmidFinder databases, respectively [9,12].

^a Number of query nucleotides found in the obtained draft genome compared to the total length of each reference gene sequence deposited in the ResFinder and/or PlasmidFinder databases.

^b GenBank accession number.

Whole genome sequencing of isolate ZTA15/01169–1EB1 revealed *mcr-1* upstream a complete PAP2 gene in a 2,074 bp contig that showed 99.96% coverage and 100% identity to the IncHI2-type plasmid pECJS-59–244 (243,572 bp; 10). The *mcr-3.2* gene was positioned in a 4,098 bp contig, sharing 100% coverage and 99.94% identity with the *mcr-3* gene located in the IncHI2-type plasmid pWJ1 (261,119 nt) previously described [1].

Most *mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3* genes are plasmidic sequences [1,4,5]. Although the PFGE and further hybridisation with *mcr-1*- and *mcr-3*-specific probes did not exclude the possibility of independent carriage by two different similar-sized plasmids, genome sequencing of isolate ZTA15/01169–1EB1 only identified the IncHI2 replicon as an appropriate candidate to harbour colistin resistance genes. We therefore assume that both genes were located on the same plasmid in our isolate.

Further efforts are focused on investigating the structure of plasmids, transmission potential, gene expression and stability of the *mcr-1* and *mcr-3.2* genes. Furthermore, the reason why co-occurrence of *mcr-1* and *mcr-3* genes confers low colistin resistance needs to be elucidated.

Acknowledgements

This study was supported by The Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (AGL2016-74882-C3), the Spanish Ministry of Agriculture and Fishing, Food and Environment, the Autonomous Community of Madrid (S2013/ABI-2747), The Junta de Extremadura (Spain) and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional; GR15075 and IB16073) and UID/MAR/04292/2013 (FCT, Portugal). M.R.I. and N.M.Q received PhD fellowships, respectively, from the “Fundación Tatiana de Guzmán El Bueno” (Spain) and the Spanish National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA) (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad; fellowship FPI2014-020).

This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession NMWW000000000. The version described in this paper is version NMWW01000000.

The authors wish to thank María García, Estefanía Rivero and Nisrin Massoumi for their technical assistance at the Foodborne Zoonoses and Antibiotic Resistance Unit.

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

Strategy design: MH, DRL, SP, MUR, LD, AQ

Experiments performance: MH, MRI, DRL, MUR, AQ

Bioinformatic analysis: MH, DRL, AQ

Manuscript writing and discussion: MH, DRL, AG, NMQ, PMV, MJC, GLO, CF, JLS, MUR, LD, AQ

References

- Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*. 2017;8(3):e00543-17. DOI: 10.1128/mBio.00543-17 PMID: 28655818
- European Commission. Commission implementing decision 2013/652/EU on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. *Official Journal of the European Union*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 14.11.2013:L 303. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2013:303:FULL&from=EN>
- Hasman H, Agersø Y, Hendriksen R, Cavaco LM, Guerra-Roman B. Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from caecal samples. *Laboratory Protocol*. Version 4. Lyngby: DTU Food; Jan 2017. Available from: http://www.eurl-ar.eu/data/images/protocols/esbl_ampc_cpeprotocol_version_caecal_january2017_version4.pdf
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7 PMID: 26603172
- Xavier BB, Lammens C, Ruhul R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill*. 2016;21(27):30280. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280 PMID: 27416987
- International Organization for Standardization (ISO). Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems -- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-1:2006.

- Geneva: ISO; 2006. Available from: <https://www.iso.org/standard/41630.html>
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Växjö: EUCAST. [Accessed: July 2017]. Available from: <http://https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init>
 8. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021 PMID: 22506599
 9. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153 PMID: 24642063
 10. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000;7(1-2):203-14. DOI: 10.1089/10665270050081478 PMID: 10890397
 11. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2640-4. DOI: 10.1093/jac/dks261 PMID: 22782487
 12. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-903. DOI: 10.1128/AAC.02412-14 PMID: 24777092
 13. Li R, Xie M, Zhang J, Yang Z, Liu L, Liu X, et al. Genetic characterization of mcr-1-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(2):393-401. DOI: 10.1093/jac/dkw411 PMID: 28073961
 14. NCBI Resource Coordinators. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D12-7. DOI: 10.1093/nar/gkw1071 PMID: 27899561
 15. Sánchez-Benito R, Iglesias MR, Quijada NM, Campos MJ, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, et al. Escherichia coli ST167 carrying plasmid mobilisable mcr-1 and blaCTX-M-15 resistance determinants isolated from a human respiratory infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;S0924-8579(17)30181-4. (Forthcoming). PMID: 28599866
 16. Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, et al. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in Escherichia coli and Salmonella enterica isolated from poultry and swine in Spain. *Res Vet Sci.* 2016;105:134-5. DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.02.003 PMID: 27033921
 17. Nonaka L, Maruyama F, Onishi Y, Kobayashi T, Ogura Y, Hayashi T, et al. Various pAQU plasmids possibly contribute to disseminate tetracycline resistance gene tet(M) among marine bacterial community. *Front Microbiol.* 2014;5(5):152. PMID: 24860553

License and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence, and indicate if changes were made.

This article is copyright of the authors, 2017.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicagInternational Society of Chemotherapy
for Infection and Cancer

Letter to the Editor

***Escherichia coli* ST167 carrying plasmid mobilisable *mcr-1* and *bla*_{CTX-M-15} resistance determinants isolated from a human respiratory infection**


CrossMark

Sir,

The emergence of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae is a matter of major concern and has instigated the recommendation for its surveillance since it compromises the use of colistin, a last-resort antibiotic [1].

The *mcr-1* gene, conferring transferable colistin resistance, has spread worldwide and has become highly prevalent in poultry and pigs, suggesting that positive pressure of antimicrobial treatments might have selected this genetic element [2]. Even worse, emerging multiresistant bacteria carrying *mcr-1* together with genes encoding extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and/or carbapenemases could compromise the effectiveness of last-resort antimicrobial therapy and, although the occurrence of the *mcr-1* resistance determinant is not yet frequent in bacteria isolated from humans, its presence requires a thorough evaluation [1].

One year after the first description of Enterobacteriaceae carrying *mcr-1* (from pigs) in the Iberian Peninsula [3], screening of human isolates with possible zoonotic origin is being approached to monitor the transfer of colistin resistance to human microbiota, where its co-expression with ESBL or carbapenemase enzymes might present the highest clinical relevance. During the first 6 months of 2016, 48 *Escherichia coli* isolates were obtained from non-urinary samples in 'S. Pedro de Alcántara' Hospital (Extremadura, Central-West Region of Spain) and were identified as ESBL- or AmpC-producers using a MicroScan® WalkAway® 96 Plus System (Beckman Coulter, Barcelona, Spain). Among them, the *mcr-1* gene was detected by PCR [2] in a unique *E. coli* strain, named HSP38, which was isolated from a 67-year old man. The patient died 11 days after hospital admission, following aggravation of his chronic obstructive pulmonary disease by a respiratory infection and failure of standard treatments with ceftriaxone administered since first day of hospitalisation and changed 1 week later to cefepime plus linezolid. Culture of sputum obtained close to the fatal outcome (Day 9) revealed the presence of strain HSP38 with an antimicrobial resistance phenotype including third-generation cephalosporins, quinolones, aminoglycosides, trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) and colistin, whereas the bacterium was found to be sensitive to amoxicillin/clavulanic acid (AMC), piperacillin/tazobactam (TZP), carbapenems and tigecycline. The minimum inhibitory concentration (MIC) for colistin was determined as 4 mg/L by Etest (bioMérieux, Madrid, Spain).

The genome of HSP38 was sequenced using an Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) at STAB facilities (University of Extremadura, Badajoz, Spain) according to the manufacturer's instructions. A total of 5.5 M reads

(217 depth) were obtained and were assembled with Assembler SPAdes v.3.9.0 plugin (Thermo Fisher Scientific) to yield a draft spanning 313 contigs (>201 bp). This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession no. **MWUH00000000 (MWUH01000000)**.

ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) showed the presence in the HSP38 genome of linked gene cassettes with the antimicrobial resistance determinants *aadA1-cmlA1-sul3*, *aadA2-dfrA12*, *aadA5-sul1-dfrA17* and *strA-strB-sul2*, in addition to the non-clustered genes *aac(3)-IIa*, *aph(3')-Ia*, *bla*_{CTX-M-15}, *lnu(F)*, *mcr-1*, *tet(B)* and *tet(34)*. Moreover, the quinolone resistance-determining region (QRDR) of GyrA presented mutations S83L and D87N, a genotype that confers quinolone resistance [4].

The clinically relevant determinants conferring antimicrobial resistance found in HSP38 were those encoding resistance to most β -lactam antibiotics and quinolones, first-choice agents used in the treatment of enterobacterial infections, and to colistin, the last-resort agent for treatment of infections with multiresistant strains. Mobilisation of plasmids carrying *mcr-1* and *bla*_{CTX-M-15} was evidenced by conjugation of HSP38 with *E. coli* J53 and selection in medium with sodium azide plus colistin or plus ampicillin. The genes *mcr-1* and *bla*_{CTX-M-15} were transferred with efficiencies of 5×10^{-2} and 2×10^{-5} , respectively, indicating their location in different plasmids and that colistin resistance is highly mobile.

Genome analysis of HSP38 using PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) allowed the detection of plasmid replicons IncX4 and IncN. The IncX4 replicon from isolate HSP38 spans the *mcr-1* gene and, assembled by plasmidSPAdes (<http://spades.bioinf.spbau.ru/plasmidSPAdes/>), it covers most of the 30-kb sequence from IncX4 plasmids carrying *mcr-1* that was recently described in enterobacteria isolated worldwide [1].

In silico typing of isolate HSP38 using MLST 1.8 (multilocus sequence typing) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) identified the bacterium as ST167, a genetic background that has been associated with clinically relevant outbreaks and ESBL expression [5]. Involvement of this bacterium in a human respiratory infection with fatal outcome, carrying a multiresistant phenotype for colistin, most β -lactam antibiotics and quinolones, with an extremely high mobilisation potential (mainly) for colistin resistance, is a matter of serious concern that must be taken into consideration before use of antimicrobial therapies and should be further surveyed in clinical units.

Funding: This work was supported by projects AGL2016-74882-C3-2-R (MINECO, Spain), GR15075 and IB16073 (Junta de Extremadura and FEDER, Spain) and UID/MAR/04292/2013 (FCT, Portugal). MRI received a fellowship from Fundación Tatiana de Guzmán El Bueno (Spain).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee for Clinical Research in the Hospital System of Cáceres (Spain) approved this work with the author's compromise for anonymity of the patient.

References

- [1] Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents* 2017;49:526–35.
- [2] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16:161–8.
- [3] Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, et al. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Res Vet Sci* 2016;105:134–5.
- [4] Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:358–73.
- [5] Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais A, Pérez-Vázquez M, et al. Spanish Network in Infectious Pathology Project (REIPI). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:173–6.

Rosario Sánchez-Benito

Servicio de Microbiología, Hospital S. Pedro de Alcántara, Cáceres, Spain

M. Rocío Iglesias

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

Narciso M. Quijada

Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain

Maria J. Campos

MARE–Marine and Environmental Sciences Centre, Instituto Politécnico de Leiria, Peniche, Portugal

María Ugarte-Ruiz

VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense Madrid, Madrid, Spain

Marta Hernández

Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología,

*Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain
Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal,
Tecnología de los Alimentos,
Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias,
Universidad de Valladolid, Palencia, Spain*

Carmen Pazos

Servicio de Microbiología, Hospital S. Pedro de Alcántara, Cáceres, Spain

David Rodríguez-Lázaro

*Unidad de Microbiología,
Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos,
Universidad de Burgos, Burgos, Spain*

Eugenio Garduño

Servicio de Microbiología, Hospital Infanta Cristina, Badajoz, Spain

Lucas Domínguez

*VISAVET Health Surveillance Centre,
Universidad Complutense Madrid, Madrid, Spain
Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense, Madrid, Spain*

Alberto Quesada *

*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética,
Edificio de Bioquímica, Facultad de Veterinaria,
Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain
INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain*

* Corresponding author.

*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética,
Edificio de Bioquímica, Facultad de Veterinaria,
Universidad de Extremadura, Av. de la Universidad s/n,
10003 Cáceres, Spain.*

E-mail address: aquesada@unex.es (A. Quesada)

16 March 2017

25 May 2017