



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*VIGILANCIA, PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE
LAS RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS DESDE LA
PERSPECTIVA ONE HEALTH*

LARA PÉREZ ETAYO



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*VIGILANCIA, PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS RESISTENCIAS
A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS DESDE LA PERSPECTIVA ONE HEALTH*

Memoria presentada por D^a **Lara Pérez Etayo** para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Navarra en el Programa de Doctorado de Medicina Aplicada y Biomedicina

El presente trabajo ha sido realizado bajo la Dirección y Codirección de los siguientes Profesores en el Departamento de Microbiología y Parasitología y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 2 de Julio de 2021

Dra. Ana Isabel Vitas Pemán

Dr. David González Fernández

A mis padres

“La recompensa de nuestro trabajo no es lo que obtenemos, sino en lo que nos convertimos”

Paulo Coelho

“Trabajar duro te llevará a la cima, disfrutar el camino te llevará más lejos”

Agradecimientos

Sin duda dejar este capítulo para el final de la tesis no ha sido casualidad... sino que no quiero acabar esta etapa, pero es cierto que no se puede cerrar sin un buen punto y final.

Como dice Izaak Walton, la buena compañía en un viaje hace que el camino parezca más corto, ¡y qué razón!, porque hace más de 7 años que llegué al **Departamento de Microbiología y Parasitología** y parece que fue ayer mismo. Así que no puedo dejar de agradecerlos como me habéis hecho sentir y todo lo que he aprendido con cada uno de vosotros/as. ¡Gracias por dejarme formar parte de esta familia, MICRO-PIÑA!

Gracias a mis directores de tesis, la Dra. Anabel Vitas y el Dr. David González por haberme dado la oportunidad de trabajar con vosotros, por la excelente dirección de esta tesis y por todo el cariño y confianza que habéis depositado en mí. **Anabel**, gracias por tu dedicación, por tu disponibilidad, por tu constancia, por tu amabilidad y, en definitiva, por transmitirme pasión hacia todo lo que haces. Gracias por la formación que me has dado en todos los ámbitos y dejarme ser partícipe de muchos otros proyectos más allá de esta tesis. Porque ha sido un placer aprender contigo y lo recordaré SIEMPRE. **David**, gracias por tu cariño, por mostrar ilusión en todo lo que he hecho, por tu dedicación en todo momento, por transmitirme paz, serenidad y tranquilidad y por darme la oportunidad de conocerte más allá de lo profesional. Recuerda todo lo que hemos aprendido este año y que siempre ¡lo mejor está por llegar!

A todos los profesores y Doctores de este Departamento. **Carlos Gamazo**, gracias por animarme en todo momento y por estar ahí siempre. A **Guillermo Martínez**, porque trabajar contigo ha sido muy enriquecedor y sin tu ayuda, el último capítulo de esta tesis no hubiese sido posible ¡Gracias! A **Ignacio Moriyón**, porque desde que llegué al departamento me trataste con un cariño muy especial y conseguiste que me quedase trabajando otro año más. Sabes que siempre seré parte del "*Brucella team*". Gracias a **Paul Nguewa** y **Nacho López-Goñi** por interesaros siempre por mí y por vuestra sonrisa. Sin olvidarme de **Raquel Conde** y **Maite Iriarte**, piezas fundamentales del grupo *Brucella*. Raquel, aún me acuerdo la primera reunión entre lloros y risas... así que, gracias por ser siempre un gran apoyo, tanto en lo profesional como en lo personal. Maite, que fueses mi directora de TFM fue un placer. Juntas aprendimos muchas cosas y si no que se lo pregunten a la anhidrasa carbónica... Gracias por todas las horas que hemos pasado juntas en tu despacho y porque sin el nexo entre dos grandes doctoras (Iriarte-Vitas), nada de esto hubiese sido posible. ¡Te estaré eternamente agradecida! Por último, gracias a todos los Doctores de la CUN, en especial a **José Leiva**. Gracias por tu conocimiento, por tu sabiduría y porque, aunque aún me cueste pronunciar nombres de muchos antibióticos, no te puedes imaginar lo que he aprendido gracias a ti. Por todas las horas que hemos pasado revisando MALDIs, placas, antibiogramas etc. ¡Mil gracias!

Gracias a **Begoña Alonso**, por tu arte, por tu sonrisa y por transmitirme ese amor por la docencia. Te hemos echado en falta después de tu jubilación, pero ¡que lo disfrutes!. A **María Orbe**, pieza fundamental de este laboratorio. Da gusto ver como organizas todo con una sonrisa. Las excursiones, los cafés y todos los trámites burocráticos, no serían lo mismo sin ti. **Rosario**, mil gracias por tu amabilidad. Porque estos últimos años hemos compartido muchas horas en CIFA y ha sido todo un placer. Por ser como una mami para nosotros: ¡hasta con tupper de Rosarillo me he ido a casa! A **Rocío**, ha sido un placer conocerte y trabajar *codo con codo* en la campana. Gracias por esas conversaciones porque has hecho que mis últimos experimentos fuesen más amenos. Mucha suerte en lo próximo que venga. A **Alberto**, que decir de ti... Ir a trabajar y verte por los pasillos disfrutando de lo que haces, es un gusto. Sabes que sin ti este departamento no sería lo mismo. Gracias por tus ánimos y por interesarte siempre por mí. Gracias por demostrarme que es posible llegar al éxito y mantenerse en pie en la cima.

A **María Díez**, tú sí que eres una pieza clave en este equipo. Gracias por las mil horas que hemos compartido juntas, por estar siempre y en todo momento para ayudarme en cualquier cosa, ya sea algún experimento o algo personal. Porque conocerte y saber que fuera del laboratorio sigues ahí, es ¡maravilloso! Por acercarme a tu familia y recibir siempre de ellos una sonrisa y un cariño muy especial. Gracias a todos de corazón. Gracias a **Elena Ojer** por pasarme el relevo. Sin tu tesis, parte de la mía no tendría sentido. Gracias por estar conmigo en mis comienzos y animarme a adentrarme en esta aventura. A **Celia**, me encanta esa simpatía que transmites siempre y es un placer compartir tiempo contigo. Gracias por interesarte siempre por mí y por compartir grandes anécdotas como excursiones en coche siendo tú la piloto.

Llega el turno de **Amiaia**. Es cierto que esta andadura no hubiese sido posible sin muchas de las personas que aparecen aquí, pero efectivamente si no te hubiese conocido a ti, no hubiese llegado hasta aquí. Porque el destino me hizo elegir a alguien de Tierra Estella (como dice Moriyón) y qué buen equipo formamos. Porque me has enseñado todo lo que sé a nivel molecular, a nivel bacteriológico, y he crecido mucho contigo a nivel profesional y personal. Gracias por permitirme hacer una segunda "tesis doctoral" a la vez y con dos artículos bien merecidos. Porque, aunque me tengas guardada en el móvil como Lara TFG, sé que me quieres más que a una alumna cualquiera. En definitiva, GRACIAS por tanto.

Porque siempre dicen que las amistades son la familia que se elige, y no podía haber elegido mejor. A **Miriam**, simplemente por ser tú. Por tu amistad. Por ese cariño y esa paz que me transmites todos los días. Desde el primer día que llegue al laboratorio sabía que ibas a ser una persona muy especial en mi vida y con el paso de los años lo he comprobado y sé que lo seguirás siendo. Gracias, gracias y gracias, por estar en mis mejores y peores momentos a mi lado. A **Bea**, no podía haber elegido una compañera de piso mejor para disfrutar de estos casi 5 últimos años. Gracias por hacerme la convivencia muy fácil, por todos los momentos de compras, de cenas, de comidas... que han sido increíbles. Gracias por tener siempre una sonrisa y tu mano extendida

para mí. Por tu confianza y porque sé que puedo contar contigo en todo momento. A **Maite**, ¡quien iba a decir que te ibas a convertir en alguien tan especial siendo la pequeñaja del grupo! Viniste para dar “guerra” y te quedaste para dar alegría. Es un gusto compartir contigo experiencias y que siempre tengas consejos para dar. Gracias por preocuparte y apoyarme.

Gracias especialmente por estar en estos últimos meses a mi lado.

Os quiero mucho a las cuatro.

Gracias al resto de mis compañeros/as de batalla. No solo por pasar horas en el laboratorio, sino por haber sabido compaginarlo con muchos momentos de ocio que nos han unido más. A **Yadira**, quien nos iba a decir que íbamos a conocernos aquí después de cuatro años de carrera. Gracias por tu alegría y tu energía, haces que nos contagiemos todos de tus ganas de disfrutar de la vida ¡Te prometo que nos vemos pronto en París!. **Leti**, siempre me ha encantado tenerte cerca. Con tus Leticiadas haces que los días se pasen más rápido; pero esas horas que hemos pasado juntas en el CIFA, nos han unido mucho más. Eres una persona increíble y lo que sí sé es que mi porcentaje de amistad hacía ti es bastante alto. A **Pepe y Sergio**, porque habéis estado tiempo siendo los únicos chicos del laboratorio y no sé cómo habéis aguantado entre tanta mujer. Sinceramente lo habéis hecho muy bien. Las casas rurales, cenas y planes no hubiesen sido lo mismo sin vosotros dos. Gracias por vuestros chistes y humor. Gracias **Melibea** porque fuiste mi primera alumna y me lo hiciste todo muy fácil. Ha sido un placer trabajar contigo y verte crecer en laboratorio (aunque no en altura). A **Aroia, Aitor, Hawraa, Rima, Pablo y Alba**, aunque no hemos compartido mucho tiempo juntos, ha sido un gusto veros por los pasillos y compartir excursiones con vosotros. Os prometo que estáis en el mejor departamento de la Universidad, así que disfrutadlo muchísimo.

A los que ya no están, pero tuve la suerte de conocer. **Pedro, Ana, Miriam A, Raquel F, Jose, Andrés, Gaby, Mammar**, y especialmente **Estrella y Marijo**. Gracias por los buenos momentos compartidos. Estrella, gracias por ponerle esa chispa andaluza a este departamento. ¡Da gusto lo apañá que eres! Marijo, gracias por todas las conversaciones y por entenderme a la perfección; pronto te retaré a subir un monte.

Gracias a todos/as los TFGs, TFMs, máster y Erasmus, **Cloe, Laura, Melibea, Cristina, Esther, Iván, Gerard y Giulia**. Porque muchos de los resultados de esta tesis no hubiesen sido posibles sin vuestra ayuda. Con vosotros/as también he descubierto que me apasiona la docencia. ¡Gracias de verdad!

Gracias a todo el personal de la CUN que me ha ayudado en todos mis experimentos realizados allí, ¡Que no han sido pocos! Especialmente a **Ana Ramos** y a **Arantxa**. Siempre habéis estado dispuestas a echarme una mano cuando más lo necesitaba.

Thank you all for the help received at the University of Surrey. Especially to **Dr. Jorge Gutierrez** and **Athanasios**. You have taken me into the wonderful world of probiotics

and lactic acid bacteria. Hopefully this will continue in the future, but what I do know is that I will always remember how you treated me there. Thanks!

Gracias a mis amigas de Biología por seguir manteniendo esta amistad. Estoy segura de que el vínculo Ribera-Navarra nos une un poco más. A **Anahi** y **Claudia**, por interesarse siempre por mi tesis, por tener siempre buenas palabras para mí y por las conversaciones que tanto me reconfortan en nuestras quedadas. A **Elisa**, compartir contigo toda nuestra trayectoria científica ha sido muy fácil. Desde la carrera me has estado aguantando día sí y día también, así que gracias por tu paciencia infinita. ¡Quien nos iba a decir que íbamos a hacer la Tesis juntas! Pero ahí hemos estado. Si es que en el fondo no te puedes separar tan fácil de mí... Gracias por hacer todo tan sencillo. Siempre me tendrás aquí y lo sabes.

Gracias a mis chicas Zagus, **Andrea**, **Laura**, **María** y **Raquel**, por interesarse siempre por mi tesis. Por compartir conmigo la estancia en Londres, y simplemente por estar ahí. Conocerlos hace 12 años fue increíble, desde el primer día me hicisteis sentirme como una más y me lo habéis demostrado siempre. Gracias por arrimar vuestro hombro durante estos últimos meses. No sabéis lo agradecida que estoy.

Es el turno de **El Jaleo**, GRACIAS, GRACIAS y GRACIAS. Porque a pesar de las adversidades, siempre conseguís restarle importancia a los problemas y las alegrías se multiplican estando con vosotras. Chicas, gracias por vuestro interés y por preocuparos por mí siempre. **Elena** que decirte a ti... ya sabes que eres como la hermana que nunca he tenido. Simplemente, gracias por ser y por estar. Porque juntas hemos podido y podremos siempre con todo lo que nos venga por delante. Te quiero infinito. Gracias por formar parte del equipo **Lajeji**. Gracias por aparecer, por animarme y por demostrarme que por muy alta que esté la montaña, siempre hay un camino hacia la cima ¡seguiremos sumando y conquistando montes!

A mi familia, especialmente a mis **primos/as**, por el cariño, apoyo y alegría que me transmitís. Seremos los 7 aquí, ahora y siempre. A **Claudia** e **Iñigo**, gracias por estar en todo momento. A **mis abuelo/as**, por vuestros abrazos, por vuestras palabras de ánimo y por ese cariño tan tierno que ojalá fuese eterno. A **Tata** y **Tío Vicen**, gracias por cuidarme siempre, por protegerme, por ayudarme y por estar a mi lado. Sois muy especiales para mí. Y por supuesto, a mis **padres**, sin los que nada de esto hubiese sido posible. Gracias por darme la oportunidad de comenzar esta andadura y por la confianza que habéis puesto en mí SIEMPRE. Gracias por apoyarme en todas mis decisiones y no dejar nunca que me derrumbe. Por ser ejemplo de constancia y perseverancia. ¡Os quiero!

Finalmente, quiero agradecer a la **Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra**, a la **Fundación Caja Navarra y Obra social "la Caixa"**, las becas otorgadas para la realización de esta tesis.

Índice



ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas.....	17
Abstract.....	21
Introducción general.....	27
1. La problemática de la resistencia a los antibióticos.....	29
2. Consumo de antibióticos en Europa.....	31
3. Resistencias antibióticas prevalentes y preocupantes	34
4. Mecanismos de resistencia a antibióticos más extendidos.....	39
5. Estrategias e iniciativas para el control de las resistencias.....	45
5.1. Iniciativa <i>One Health</i>	46
5.2. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos propuesto por la OMS.....	48
5.3. Plan Nacional de resistencia a antibióticos (PRAN)	49
6. Medidas alternativas de tratamiento y mejora de los métodos de diagnóstico.....	53
Hipótesis y objetivos.....	57
Resultados y discusión.....	63
Objetivo 1.....	65
<u>Capítulo 1:</u> Aislamiento y caracterización de bacterias multirresistentes en distintos ecosistemas acuáticos.....	69
1. Introducción	71
2. Material y métodos.....	74
3. Resultados.....	83
4. Discusión.....	97
<u>Capítulo 2:</u> Caracterización filogenética de cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas de alimentos, aguas y portadores sanos.....	103
1. Introducción	105
2. Material y métodos.....	107
3. Resultados.....	115
4. Discusión	128
Objetivo 2.....	135
<u>Capítulo 3:</u> Caracterización de elementos genéticos móviles en cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE.....	139

1. Introducción	141
2. Material y métodos.....	143
3. Resultados y discusión.....	147
<u>Capítulo 4:</u> Caracterización de factores de virulencia y capacidad conjugativa en cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE	157
1. Introducción	159
2. Material y métodos.....	161
3. Resultados	165
4. Discusión	172
Objetivo 3.....	179
<u>Capítulo 5:</u> Estudio de la capacidad bactericida de nanomateriales con base plata para su posible inclusión como aditivos en piensos.....	183
1. Introducción	185
2. Material y métodos.....	189
3. Resultados	197
4. Discusión	208
Objetivo 4.....	213
<u>Capítulo 6:</u> Detección e identificación rápida de Enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas mediante tecnología MALDI-TOF MS.....	217
1. Introducción	219
2. Material y métodos.....	222
3. Resultados	229
4. Discusión	238
<u>Capítulo 7:</u> Uso de péptidos derivados de la lactoferrina y de bacterias lácticas frente a <i>E. coli</i> productoras de BLEE.....	243
1. Introducción	245
2. Material y métodos.....	249
3. Resultados	261
4. Discusión	275
Discusión general	281
Conclusiones	299
Bibliografía	305

Abreviaturas

- AgNPs:** nanopartículas de plata
- AMC:** Amoxicilina-ácido clavulánico
- AMP:** Ampicilina
- AMPs:** *Antimicrobial peptides*
- AMR:** *Antimicrobial resistances*
- AMS:** Ampicilina-sulbactam
- APBA:** Ácido aminofenilborónico
- APEC:** *Escherichia coli* patógena aviar
- APT:** Agua de peptona tamponada
- ARB:** *Antibiotic resistant bacteria*
- ARG:** *Antimicrobial resistance gene*
- ASM:** *American Society for Microbiology*
- AZI:** Azitromicina
- AZT:** Aztreonam
- BAL:** Bacterias ácido-lácticas
- BHI:** *Brain Heart Infusion*
- BLEE:** β-lactamasas de espectro extendido
- CAZ:** Ceftazidima
- CC:** Complejo clonal
- Cd:** Clindamicina
- CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo
- CFU:** *Colony-forming unit*
- CHL:** Cloranfenicol
- CIP:** Ciprofloxacino
- CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria
- CMB:** Concentración Mínima Bactericida
- COL:** Colistina
- CPD:** Cefpodoxima
- CRO:** Ceftriaxona

CXM: Cefuroxima

CZ: Cefazolina

DAP: Daptomicina

DDST: *Double-disk synergy test*

DHD: Antibióticos de dosis diarias definidas por mil habitantes y día

EARSS: *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: *European Food Safety Authority*

EMA: Agencia Europea del Medicamento

ERY: Eritromicina

ESBL: *Extended-spectrum β -lactamases*

ESGARS: *Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance*

ETP: Ertapenem

EUCAST: *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

ExPEC: *E. coli* patógenas extraintestinales

FA: Ácido fusídico

FEP: Cefepime

FE: Nitrofurantoina

FMT: *Fecal microbiota transplant*

FOT: Fosfomicina

FOX: Cefoxitina

GM: Gentamicina

GFP: *Green Fluorescent Protein*

HCCA: Ácido alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic

HGT: *Horizontal gene transfer*

ICIF: Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada

IDSAs: *Infectious Diseases Societies of America*

IMP: Imipenem

IRAS: Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria

ISO: *International Organization for Standardization*

JIACRA: *Joint Inter-agency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis*

LV: Levofloxacino

LZ: Linezolid

MALDI-TOF MS: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*

MBL: Metalo- β -lactamasas

MER: Meropenem

MDR: *Multidrug Resistances*

MGSS: *Mobile Genetics Elements*

MH: Mueller Hinton

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

MRSA: *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*

MST: *Minimum Spanning Tree*

MUP: Mupirocina

MXF: Moxifloxacino

MZ: Mezlocilina

NOR: Norfloxacino

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OX: Oxacilina

P: Penicilina

PBP: *Penicillin binding protein*

PCU: Population Correlation Unit

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PDR: Pan-Resistencia

PIP: Piperacilina

PMBN: *Polymyxin B nonapeptide hydrochloride cationic cyclic peptide*

PRAN: Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos

PROA: Programas de Optimización de Uso de los Antibióticos

RA: Rifampicina

RAM: Resistencia antimicrobiana

ST: Secuencia Tipo

SYN: Sinercid

SWI: *Small World Initiative*

SXT: *Trimethoprim-sulfamethoxazole*

TEC: Teicoplanina

TET: Tetraciclina

TIG: Tigeciclina

TO: Tobramicina

TSA: *Trypto-Casein Soy Agar*

TZP: Piperacilina-tazobactam

VA: Vancomicina

VF: Virulence factor

VRE: *Vancomycin resistant Enterococcus*

WHO: *World Health Organization*

WWTPs: *Wastewater Treatment Plants*

XDR: *Extensively Drug Resistance*

Abstract



Before the outbreak of the pandemic Covid-19, one of the greatest threats to medicine in the 21st century was and continues to be the antimicrobial resistances (AMR). In order to address this problem with a global perspective and taking into account the strategic lines proposed by the Spanish National Antibiotic Resistance Plan (PRAN), the **general objective** of this work has been to approach the surveillance, prevention, diagnosis and treatment of resistance to antibiotics, with special emphasis on the extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL).

The **first objective** focused on the surveillance of the resistances in different environments. In **Chapter 1** it was reported the isolation and characterization of priority pathogens according to the WHO list from rivers, wastewater treatment plants (WWTPs) and collectors in northern Spain and southern France (POCTEFA area). The results showed that 100% of the WWTPs and collectors and 96.4% of the rivers carried resistant bacteria against at least one of the following antibiotic families: β -lactams, carbapenems, vancomycin and colistin. More than a half of the 55 isolated strains come from wastewater environments and multidrug resistances (MDR) were observed in 96.4% of them, with penicillin/cephalosporin resistance being the most widespread. In agreement with that, in **Chapter 2** we performed the phylogenetic characterization of ESBL-producing *E. coli* strains, isolated from animal, environmental and human environment in the present and previous studies. Important clonal complexes (23CC, 10CC, 131CC and 38CC) related to the spread of β -lactam antibiotic resistance genes were found, but none of them was present in all sources. However, wastewater environments housed these 4 CCs and showed identical profiles to strains isolated from other environments, showing the importance that water acquire in the dissemination of these resistances.

The **second objective** addressed the study of the **diffusion** of resistance among the different ecosystems. Therefore, in **Chapter 3** the characterization of integrons and insertion sequences was carried out. Results showed the wide presence and dissemination of *intI1* (92%), IS26 (99.4%) as well as the genetic pattern IS26-ISEcp1 (related with the pathogenic clone 131CC) that was present in 22% of the strains. The coexistence of various types of integrons and insertion sequences suggests a possible risk of spread of resistance between different environments. Meanwhile, in **Chapter 4** it was analysed the genetic profiles associated with virulence factors, as well as the conjugative capacity presented by these *E. coli* strains. Virulence genes *fimA*, *papC*, and *aer* were detected in all environments, *papG* III was mainly associated with clinical strains, and wastewater was a point of diffusion for *cnf1* and *hlyA* genes. In addition, isolated strains from aquatic environments showed a significantly higher conjugation frequency than those coming from farms and food, pointing one more time the importance that the aquatic environment acquires for the exchange of genes and resistance to antibiotics.

The **third objective** consisted of evaluating a proposal for the **prevention** of AMR in animal environment. Thus, in **Chapter 5** it was assessed the antimicrobial activity of silver nanomaterials to be added in feed as an alternative to the use of antibiotics in animal production. The results showed that C3 product has antimicrobial activity against a wide spectrum of bacteria (including sensitive and resistant ones), with a higher bactericidal activity against Gram negative bacteria (lower concentration needed and faster reduction of viable microorganisms than in the case of *S. aureus*).

Finally, in the **fourth objective**, **diagnostic** and **treatment** alternatives for infections caused by ESBL-producing Enterobacteriaceae were addressed. In **Chapter 6** a cefotaxime hydrolysis protocol has been defined that allows rapid detection of ESBL-

producing strains (CTX-M1 type) by using the VITEK®-MS RUO (bioMérieux). Secondly, in **Chapter 7** two treatment alternatives have been tested; on the one hand, the activity of two antimicrobial peptides derived from lactoferricin (P4-1 and P2-15) was evaluated against ESBL-producing *E. coli*. Despite subinhibitory concentrations of both peptides in the presence of 1 µg/ml of clavulanic acid managed to reduce the MIC of the antibiotic, none of them achieved sensitization to amoxicillin. On the other hand, the antibacterial activity of the metabolites produced by 3 lactic acid bacteria (C1, A1 and C34) of animal origin was studied, confirming that they were capable of inhibiting the growth of ESBL-producing *E. coli*, being *L. plantarum* C1 the most active one, showing a genetic cluster compatible with the plantaricin-type bacteriocin.

The data obtained in this Doctoral Thesis have shown that it is necessary to carry out a more effective control of the presence of MDR bacteria in the **aquatic environment**, implementing surveillance of relevant clonal complexes that act as markers for the presence of resistant bacteria as well as more effective wastewater treatment programs to stop the dispersion. In relation to the **animal environment**, a silver nanomaterial was positively evaluated as possible feed additive to replace or reduce the use of antibiotics in animal production. Finally, with regard to **human health**, a rapid diagnostic protocol for the detection of *bla*_{CTX-M1}-producing *Enterobacteriaceae* was developed using the VITEK®-MS RUO equipment. In addition, the antimicrobial activity of the three tested LAB was confirmed, but further studies are necessary before considering their possible therapeutic application.

Introducción general



1. La problemática de la resistencia a los antibióticos

La penicilina fue el primer antibiótico descubierto por Alexander Fleming en 1928, un hecho que se constituyó como uno de los hallazgos más extraordinarios del siglo XX, revolucionando la medicina y cambiando así el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Vrancianu et al., 2020). A partir de este momento, se inició la “era de los antibióticos” con el descubrimiento de una gran variedad de familias de dichos compuestos (aminoglucósidos, macrólidos, tetracilinas, etc.) (Torres, 2012; Tang et al., 2014). Pero rápidamente comenzaron a detectarse las primeras cepas de *Staphylococcus* resistentes a penicilina, dando lugar a una evolución hacia la resistencia a los antimicrobianos (Brooks and Brooks, 2014). Aunque la industria farmacéutica fue modificando estructuralmente las distintas moléculas antibióticas para intentar evadir los diferentes mecanismos de resistencia generados por las bacterias, éstas conseguían desarrollar nuevos mecanismos tal como se muestra en la Figura I.1.

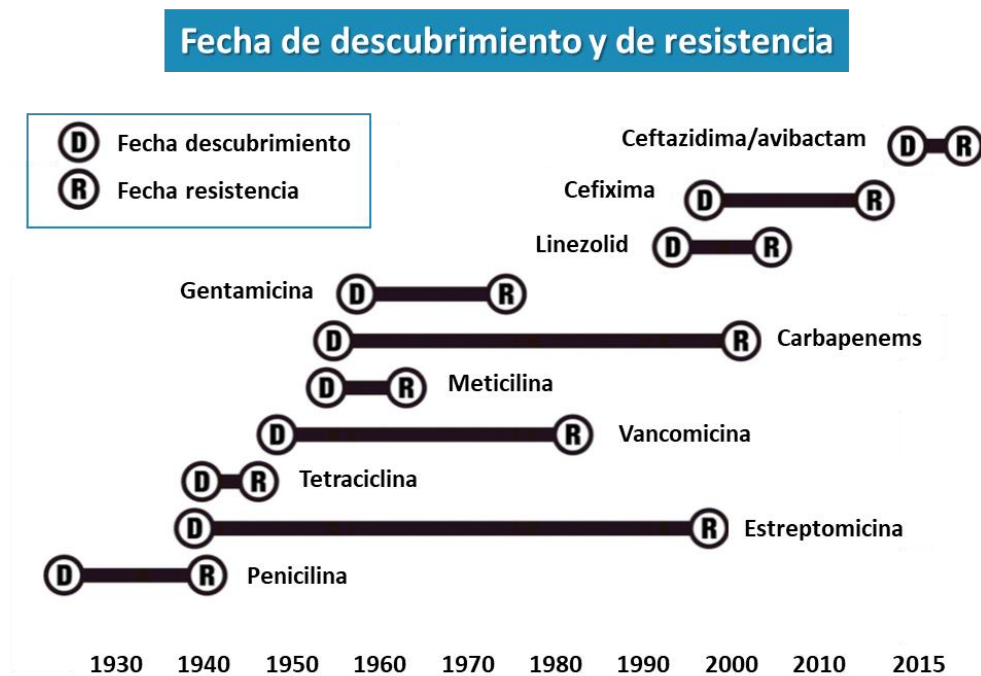


Figura I.1. Diagrama que muestra el tiempo transcurrido entre el descubrimiento de un nuevo antibiótico y la aparición de resistencias al mismo. Adaptado de Brooks and Brooks (2014) y CDC (2019).

Aunque son muchos los factores que favorecen la selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos, el uso inapropiado e indiscriminado de los mismos en medicina, veterinaria y ganadería es uno de los principales factores que han contribuido a este fenómeno (Finch and Hunter, 2006; Radhouani et al., 2014). Los microorganismos han sabido adaptarse a estas circunstancias adversas a través de las resistencias, con lo que han conseguido aumentar la supervivencia de los patógenos en múltiples entornos y limitando así las distintas opciones de tratamiento para las enfermedades infecciosas (Sultan et al., 2018). Este dramático aumento en la incidencia de patógenos resistentes a los antibióticos es un hecho que afecta a toda la población mundial, perjudicando a diferentes entornos como la salud humana y animal, la agricultura y el medioambiente. Por ello, hoy en día constituye uno de los mayores problemas de Salud Pública (WHO, 2014), considerándose como una de las mayores amenazas a las que se enfrenta la medicina moderna en el siglo XXI. Las infecciones causadas por bacterias resistentes reducen dramáticamente sus posibilidades de ser tratadas, lo que conlleva a un aumento en la morbilidad, mortalidad, complicaciones severas e incremento del tiempo de ingreso hospitalario, generando así un elevado coste económico en Salud Pública (Founou et al., 2017). Solo en la Unión Europea se estima un gasto de 1.500 millones de euros anuales, que extrapolado a cifras nacionales representa un coste de alrededor de 150 millones de euros anuales (ECDC/EMEA, 2009). De la misma forma, se especula que las muertes humanas causadas por microorganismos resistentes podrían aumentar aproximadamente de las 700.000 por año que ocurren actualmente a 10 millones para el año 2050, si no se pone una solución a esta problemática (O' Neill, 2014; WHO, 2014). En definitiva, en menos de 100 años se podría pasar de una “era de los antibióticos”, a una “era post-antibiótica”, lo que muchos expertos vaticinan como la gran pandemia del siglo XXI.

2. Consumo de antibióticos en Europa

Existen grandes diferencias en las tasas de consumo de antibióticos destinados a salud humana entre los distintos países europeos, pero un estudio del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) realizado en el año 2012, estimó que en un día cualquiera, en torno al 30% de los pacientes ingresados en los hospitales europeos recibía al menos un antibiótico (ECDC, 2012). Además, este estudio mostró que España se encuentra por encima de la media europea, con unas cifras estimadas del 46%, lo que nos sitúa en quinta posición en cuanto al consumo de antibióticos en Europa a nivel hospitalario. Gracias a las iniciativas que veremos posteriormente, los datos más recientes nos indican que se ha producido un descenso muy significativo en el consumo total de antibióticos de dosis diarias definidas por mil habitantes y día (DHD), mostrándose una bajada del 11,8% entre los años 2015 y 2019 (PRAN, 2020). Así, la media española de consumo total en esta área ha pasado de las 28,1 DHD de 2015 a las 24,9 DHD registradas en 2019. Sin embargo, todavía sigue siendo uno de los países que más antibióticos consume a nivel hospitalario, tal como se muestra en la Figura I.2 (ECDC, 2020).

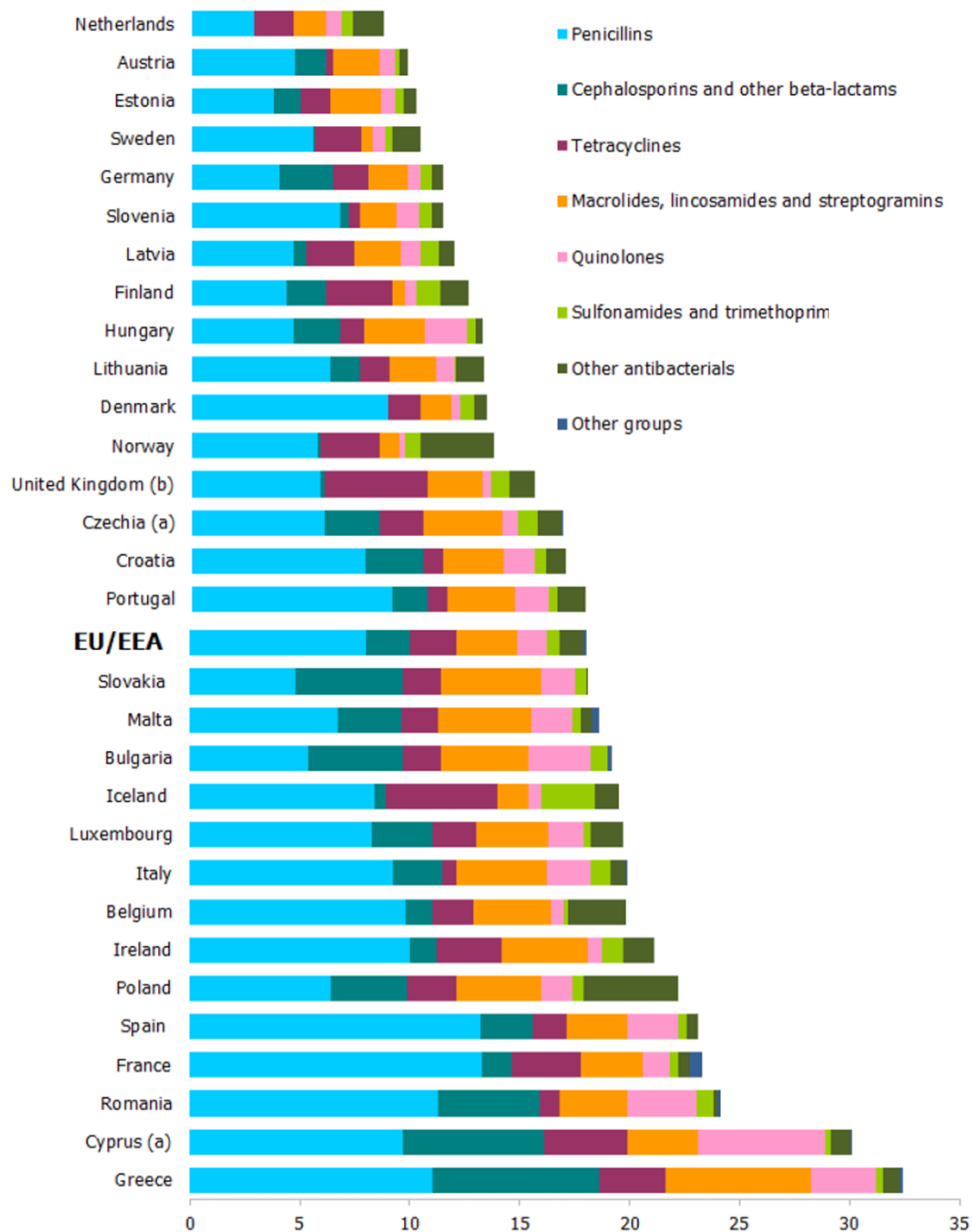


Figura I.2. Consumo de antibióticos (expresado como DHD) a nivel hospitalario en los distintos países de Europa en el año 2019 (ECDC, 2020).

Los datos de consumo de antibióticos en ganadería proporcionados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) también mostraron una gran diferencia en las ventas de estos productos entre los distintos países de Europa en el año 2018 (Figura

I.3), con un rango que oscila de 2,9 a 466,3 mg/PCU (mg de ingrediente activo vendidos por Unidad de Correlación Poblacional), siendo España el tercer país de la UE donde más antibióticos se emplearon en la cría de ganado (219,2 mg/PCU, respecto a la media europea de 107 mg/PCU) (EMA, 2020). Afortunadamente, el último informe proporcionado por el Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (PRAN) muestra una reducción de un 13,6% en las ventas de antibióticos en este sector en España (PRAN, 2020).

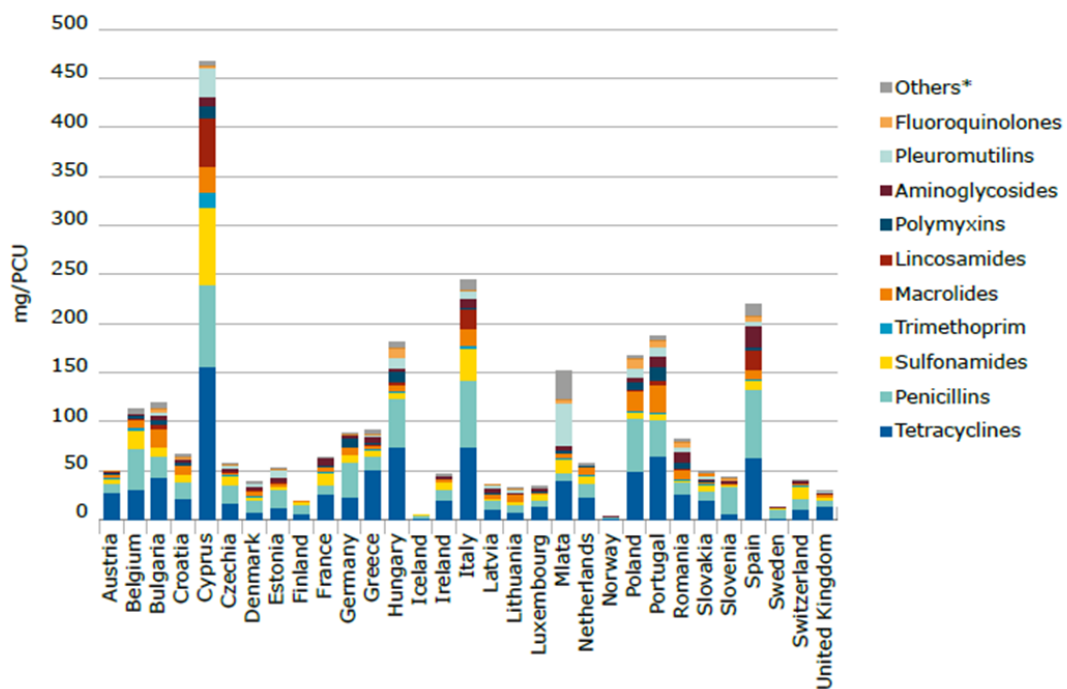


Figura I.3. Consumo de antibióticos en ganadería (expresado como mg/PCU), en los distintos países de Europa en el año 2018 (EMA, 2020).

El análisis global del consumo de antibióticos y de resistencias bacterianas, demuestra la existencia de correlaciones positivas entre el consumo de los mismos y los porcentajes de resistencia, tal como indican los datos aportados por los informes JIACRA (ECDC/EFSA/EMA, 2015, 2017). De esta manera, se estima que una reducción en el consumo tendría una mayor repercusión en la reducción de resistencias.

3. Resistencias antibióticas prevalentes y preocupantes

A principios del 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió por primera vez en su historia la lista de “bacterias prioritarias” resistentes a los antibióticos, clasificadas en grupos de prioridad crítica, elevada y media según la urgencia con la que se necesitan los nuevos antibióticos (WHO, 2017a). Esta lista incluye los 12 patógenos que representan la mayor amenaza hoy en día para la salud humana, con el objetivo de llevar a cabo una investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por dichas bacterias.

A finales del siglo XX, los principales problemas de resistencias estaban causados por bacterias Gram positivas como *S. aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus* spp. resistente a glucopéptidos. Aunque hoy en día persisten estas resistencias, la lista publicada por la OMS advirtió sobre la aparición de patógenos Gram negativos resistentes a múltiples medicamentos (Shrivastava et al., 2018), capaces de acumular resistencia a todos (pan-resistencia, PDR) o a casi todos los antibióticos disponibles (resistencia extensa o XDR). Por ello, hay una urgente necesidad de desarrollar nuevos fármacos y establecer soluciones eficaces frente a estos patógenos. En el grupo de prioridad crítica se incluye la resistencia a los carbapenems generada por *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias, así como enterobacterias productoras de β -lactamasas, resistentes a la 3ª generación de cefalosporinas. Entre los patógenos de prioridad elevada encontramos *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina. El acrónimo **ESKAPE** une los nombres de patógenos que son altamente resistentes a la mayoría de los antibióticos y causan la mayoría de las infecciones hospitalarias en todo el mundo (*Enterococcus*

faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*) (Navidinia, 2016).

En el año 2010, el porcentaje de bacterias de *A. baumannii* resistentes a los carbapenems en los hospitales españoles superó el 80% (Hernández Torres et al., 2010). Asimismo, este estudio mostró que el 94% de las cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes en nuestro país son multirresistentes (MDR) y el 2% son PDR. En la Figura I.4 se muestra el porcentaje de cepas de *A. baumannii* resistente a carbapenems aisladas en 2019 en Europa (ECDC, 2019), en donde se puede observar como España tiene una prevalencia entre un 50-75 %, superior a la observada en países del centro y norte de Europa.

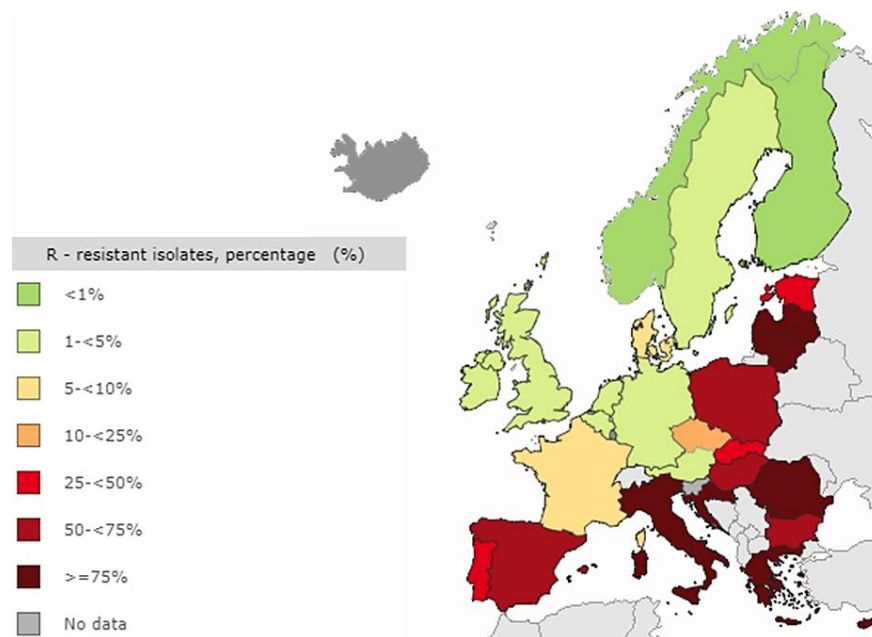


Figura I.4. Porcentajes de aislamiento de *A. baumannii* resistente a carbapenems en 2019 en Europa (ECDC, 2019).

De la misma manera, el aislamiento de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a uno o varios antibióticos es común en Europa. La mayor parte de los países informan de porcentajes de resistencia elevados en todos los grupos de antibióticos que se encuentran bajo vigilancia, siendo especialmente preocupante el aumento de resistencia a carbapenems (Figura I.5).

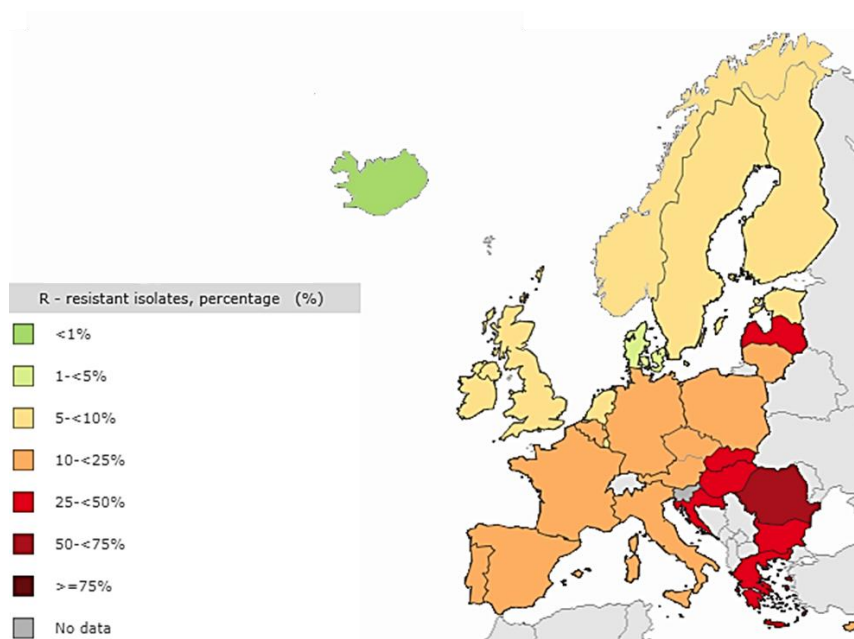


Figura I.5. Porcentajes de aislamiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenems en 2019 en Europa (ECDC, 2019).

En los últimos años se ha observado que entre las nuevas bacterias resistentes destacan muchos miembros de la familia Enterobacteriaceae (Mulani et al., 2019), especialmente en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp, detectándose un aumento en la adquisición de genes que les confieren resistencia frente a carbapenems y cefalosporinas de nueva generación (Garcia-Migura et al., 2014). Según los datos del ECDC, más de la mitad de los aislamientos de *E. coli* en 2019 fueron resistentes al menos a una clase de los antibióticos que se encuentran bajo vigilancia y también fue frecuente la resistencia combinada a varios grupos de antimicrobianos (ECDC, 2019). Así pues, tal como se puede observar en la Figura I.6, el porcentaje de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) con resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, aumentó significativamente en Europa desde el año 2002 al 2019.

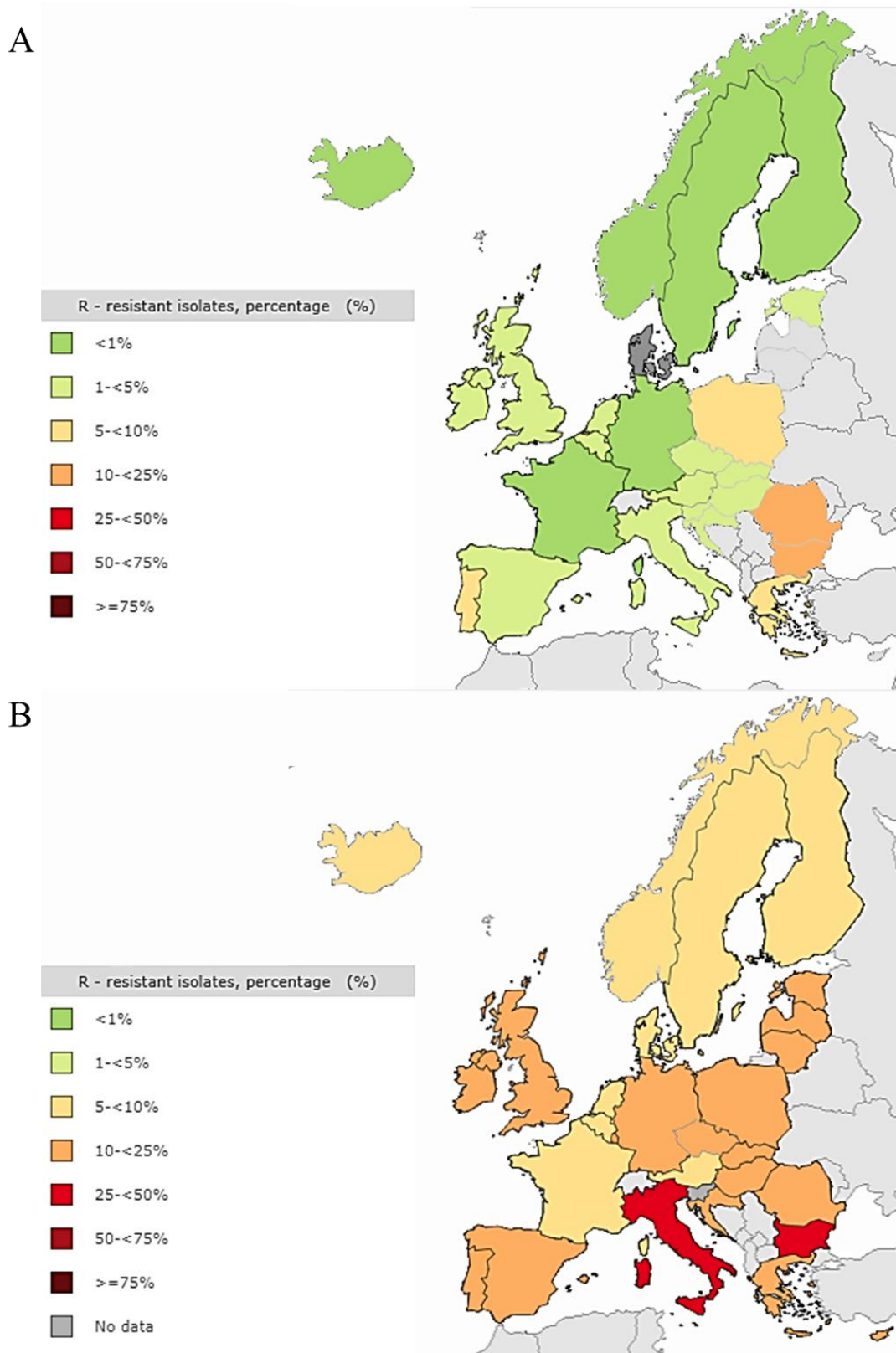


Figura I.6. Porcentajes de aislamiento de *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación en Europa (ECDC, 2019). A) Año 2002; B) Año 2019

Los tratamientos de elección para cepas productoras de BLEE generalmente se basan en el empleo de carbapenems, pero existen cepas resistentes a estos antibióticos debido a la producción de carbapenemasas del tipo KPC. En estos casos de bacteriemia derivada de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas, se recurre al empleo de una polimixina, la colistina (Mensa, 2014). No obstante, el incremento en el uso de este antibiótico en producción porcina, ha dado lugar a un aumento en la resistencia de las enterobacterias al mismo (Rhouma et al., 2016). Actualmente se conoce un mecanismo genético por el cual el gen *mcr-1* confiere resistencia a colistina, siendo el primer mecanismo conocido de transmisión relacionada con un plásmido (McGann et al., 2016).

Como hemos señalado anteriormente, en la última década también han empezado a incrementarse las resistencias entre bacterias Gram positivas, como *Enterococcus faecium* resistentes a glucopeptidos y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). De hecho, un hallazgo de especial preocupación ha sido el aumento en el porcentaje de cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina en la UE, del 10,5% en 2015 al 18,3% en 2019 (Figura I.7).

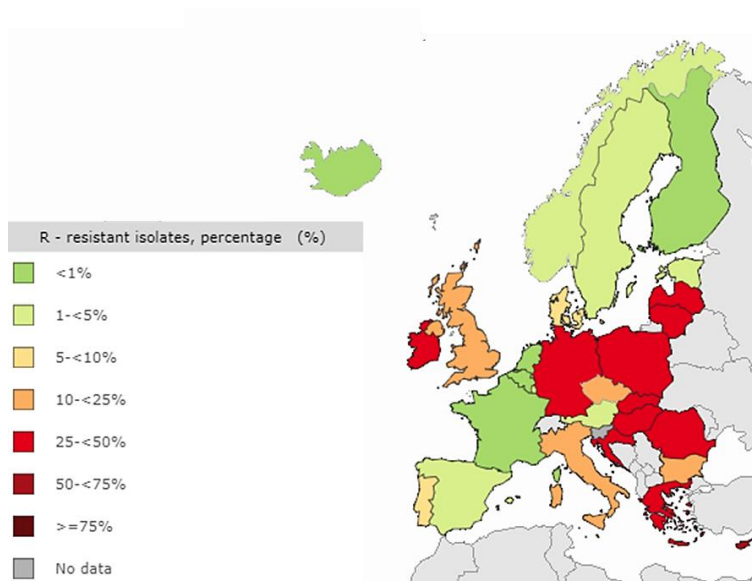


Figura I.7. Porcentajes de aislamiento de *E. faecium* resistente a vancomicina (VRE) en 2019 en Europa (ECDC, 2019).

La proliferación de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) ha sido responsable del tipo de infección nosocomial más frecuente en todo el mundo (Stryjewski and Corey, 2014). La incidencia de aislamientos de MRSA en los países de Europa presenta una gran variabilidad, con porcentajes que oscilan entre <1% y 50% (Figura I.8). Aunque en general se observó una disminución en el porcentaje de aislados resistentes en el año 2019, sigue siendo un patógeno importante en la UE, con niveles aún altos en varios países y con resistencia combinada a otro grupo de antimicrobianos como los glucopéptidos. De hecho, la aparición de cepas de *S. aureus* que combinan el fenotipo MRSA con resistencia a vancomicina (VRSA) se produjo desde hace ya tiempo (Chang, 2003). Afortunadamente, la daptomicina es el antibiótico de elección para estas cepas, siendo la incidencia de bacterias resistentes a este antibiótico todavía muy baja (Baltz et al., 2005).

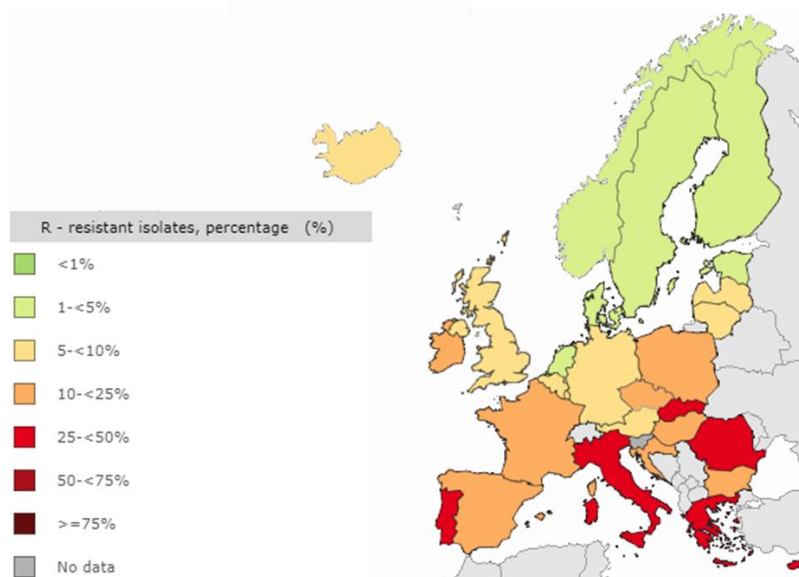


Figura I.8. Porcentaje de aislamiento de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) en 2019 en Europa (ECDC, 2019).

4. Mecanismos de resistencia a antibióticos más extendidos

Como hemos visto con anterioridad, los microorganismos tienen la capacidad de desarrollar distintos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, que se diferencian según su base genética. La resistencia **cromosómica o natural** es intrínseca de algunos

géneros bacterianos, como es el caso de *P. aeruginosa* resistente a cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, tetraciclinas, o macrólidos (Saiman, 2007), mientras que la **resistencia adquirida** se debe a la aparición de mutaciones o intercambio de elementos genéticos, como integrones, transposones o secuencias de inserción (Rodríguez-Martínez et al., 2006).

En general, los mecanismos de resistencia se pueden dividir en cuatro tipos principales (Figura I.9) (Brooks and Brooks, 2014; Sultan et al., 2018):

- 1) Baja permeabilidad o impermeabilidad de la envoltura celular al antibiótico, que suele darse por mutaciones en las porinas.
- 2) Expresión de bombas de expulsión activa que eliminan el antibiótico al exterior.
- 3) Producción de enzimas que inactivan los antibióticos por hidrólisis o modificación de éstos, como por ejemplo las β -lactamasas.
- 4) Alteración y modificación de la diana antibiótica, disminuyendo la capacidad de unión al mismo, como por ejemplo la resistencia a glucopéptidos en *E. faecium* VRE.

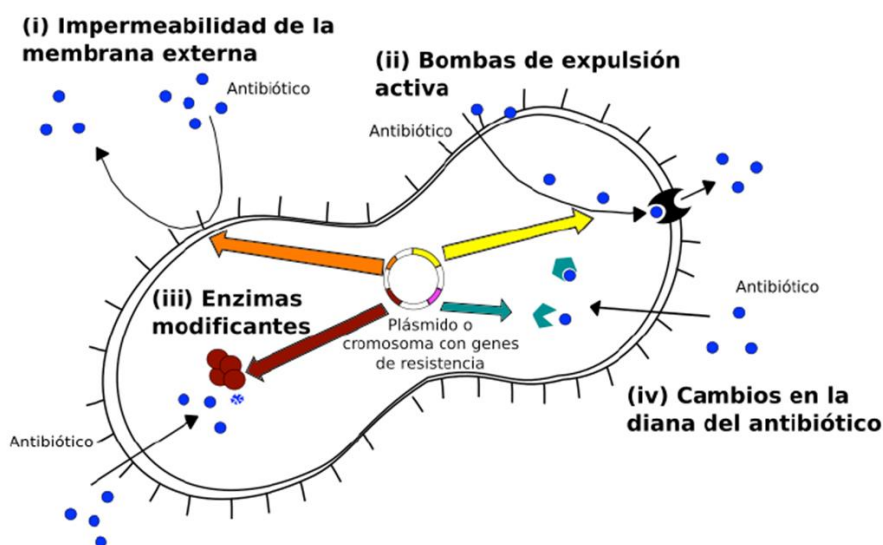


Figura I.9. Principales mecanismos de resistencia empleados por las bacterias para neutralizar la acción de los antibióticos (Ferrer-Espada, 2016).

De estos mecanismos, el más extendido es la producción de enzimas del tipo β -lactamasas, capaces de hidrolizar a los antibióticos β -lactámicos. Éstos constituyen el grupo de antibióticos más amplio y más utilizado en el tratamiento de infecciones causadas tanto en clínica humana como veterinaria. Su extensiva aplicación se debe a la excelente capacidad antibacteriana que tienen, así como a la baja toxicidad que presentan (Tang et al., 2014). Se caracterizan por poseer un anillo β -lactámico que actúa como análogo del sustrato de las PBP (*penicillin binding protein*), enzimas que participan en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias. La similitud estructural del grupo amida del anillo β -lactámico con el dipéptido D-alanil-D-alanina de la mureína, les permite unirse e inactivar estas enzimas (Fisher and Mobashery, 2009; Suárez and Gudiol, 2009). Este anillo β -lactámico va unido generalmente a un anillo secundario cuya naturaleza determina los diferentes tipos de antibióticos que conforman esta familia. Así, según su estructura química estos antibióticos se han clasificado en cuatro familias: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactams (Tabla I.1).

Tabla I.1. Principales antibióticos β -lactámicos empleados en clínica

Familia	Antibióticos	
Penicilinas	Bajo espectro	Bencilpenicilina, meticilina, oxacilina
	Amplio espectro	Amoxicilina, ampicilina, animopenicilina
	Espectro extendido	Piperacilina, mezlocilina, ticarcilina
Cefalosporinas	1ª Generación	Cefalexina, cefalotina, cefazolina
	2ª Generación	Cefoxitina, cefuroxima, cefotetán
	3ª Generación	Ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima
	4ª Generación	Cefepima, cefpiroma
Carbapenems	Imipenem, meropenem, ertapenem	
Monobactams	Aztreonam	

Las enzimas β -lactamasas se localizan en el espacio periplásmico e hidrolizan irreversiblemente el enlace amida de este anillo β -lactámico, transformando el antibiótico en un compuesto inactivo. Su síntesis puede ser constitutiva (codificada a

nivel cromosómico o plasmídico) o inducida por los propios antibióticos (Pratt, 2016). Existen varios esquemas de clasificación de β -lactamasas que se han ido actualizando a lo largo del tiempo y la clasificación más reciente es la propuesta por Bush-Jacoby-Medeiros (Bush and Jacoby, 2010) que se muestra en la Tabla I.2. Ésta, divide a las β -lactamasas en cuatro grupos y en la que se combinan los criterios de funcionalidad de clasificaciones anteriores con datos de codificación y actividad enzimática.

Tabla I.2. Clasificación de las β -lactamasas según Bush y Jacoby (2010)

Grupo funcional (Bush)	Características
Grupo 1	Cefalosporinas cromosómicas y plasmídicas Resistentes a β -lactámicos (excepto carbapenems) No inhibidas por ácido clavulánico Engloba a las cefalosporinas de tipo AmpC
Grupo 2	Penicilinasas, cefalosporinas, oxacilinasas y carbapenemasas Codificación plasmídica (mayoría) Inhibidas por el ácido clavulánico
2a	Penicilinasas
2b	β -lactamasas de amplio espectro (BLEA) Penicilinasas y cefalosporinas
2be	β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) Inactivan cefalosporinas de 3 ^a generación y monobactams
2br	β -lactamasas de tipo IRT (Inhibidor resistente TEM) Resistentes a inhibidores como ácido clavulánico y sulbactam, pero no al tazobactam
2c	β -lactamasas que hidrolizan carbenicilinas β -lactamasas con acción frente a cloxacilinas
2d	Inhibidas escasamente por ácido clavulánico Incluyen algunas BLEEs tipo OXA
2e	Cefalosporinas que hidrolizan monobactams
2f	Carbapenemasas con serina en su centro activo
Grupo 3	Metallo- β -lactamasas (zinc en su sitio activo) Inhibidas por agentes quelantes como el EDTA Codificación cromosómica o plasmídica No inhibidas por ácido clavulánico Resistentes a carbapenems y β -lactámicos No hidrolizan monobactams
Grupo 4	Penicilinasas de codificación cromosómica No inhibidas por ácido clavulánico

Dentro del grupo 2 nos encontramos con las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o *extended-spectrum β -lactamases* (ESBLs). Son enzimas de codificación plasmídica que suponen una gran amenaza debido a que son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a y 4^a generación y monobactams. Además, son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, mientras que los carbapenems y las cefamicinas no son hidrolizados por las mismas (Pratt, 2016). La denominación BLEEs engloba en la actualidad a más de 200 enzimas que se clasifican en diferentes tipos según su secuencia de aminoácidos, siendo las más frecuentes las que se describen a continuación:

- a) TEM: confieren resistencia a ampicilina, penicilina y a cefalosporinas de 1^a generación y son las más frecuentemente descritas en enterobacterias. Las sustituciones de un solo aminoácido en distintas posiciones en la secuencia del gen *bla*_{TEM-1} dan lugar a una gran variedad de fenotipos BLEEs. Este tipo de enzimas se localizan generalmente en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* y en otros microorganismos como *P. aeruginosa* (Abdelrahman et al., 2021)
- b) SHV: confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas de 1^a generación. En un principio, las enzimas más frecuentemente descritas fueron SHV-2 y SHV-5, pero en la actualidad es SHV-12 la principalmente aislada en Europa (Paterson and Bonomo, 2005).
- c) CTX-M: Son enzimas que hidrolizan preferentemente la cefotaxima por lo que se les llamaba cefotaximasas. Son activas frente a cefuroxima y cefepime y son inhibidas por tazobactam mejor que por ácido clavulánico o sulbactam (Nordmann et al., 2012). Engloban más de 70 enzimas que se clasifican filogenéticamente en cinco grupos según su secuencia de aminoácidos, con una identidad superior al 94% dentro de cada grupo (Bonnet, 2004): grupo CTX-M1,

que incluye CTX-M-1 y CTX-M-15 entre otros; grupo CTX-M2, grupo CTX-M8; grupo CTX-M9, donde se incluye CTX-M-9 y CTX-M-14 entre otros y el grupo CTX-M25.

- d) OXA: Son BLEEs activas contra oxacilina, cloxacilina y bencilpenicilina y son poco inhibidas por el ácido clavulánico. La primera enzima descrita, OXA-1, se localizó en *E. coli* aunque posteriormente se ha detectado en otras especies como en *P. aeruginosa* y en *A. baumannii* (Barlow and Hall, 2002).

Además, en los últimos años han tomado relevancia las β -lactamasas del grupo 1, también denominadas β -lactamasas AmpC, debido al incremento de bacterias causantes de infecciones clínicas portadoras de estas enzimas. Son capaces de hidrolizar cefalosporinas de 3ª generación, cefamicinas e inhibidores de β -lactamasas; sin embargo, no hidrolizan a los carbapenems (Seral et al., 2012). En la actualidad se han descrito genes codificantes de estas enzimas en plásmidos y asociados a integrones. En *E. coli* son enzimas de baja expresión, pero algunas mutaciones en genes reguladores pueden dar lugar a una hiperexpresión de las mismas (Jacoby, 2009). Igualmente, la preocupación también es creciente en torno a las carbapenemasas, ya que los carbapenems son una de las pocas alternativas antibióticas que se disponen en caso de infecciones causadas por BLEEs (Thomson, 2010; Bou et al., 2014). Son enzimas de codificación plasmídica o cromosómica e hidrolizan cefalosporinas de 3ª generación, carbapenems y monobactams. Son inhibidas por ácido clavulánico, pero no por EDTA. Se han descrito varias variantes como IMP, VIM, IMI, KPC o GES (Pérez, 2007).

5. Estrategias e iniciativas para el control de las resistencias

En los últimos años han surgido numerosas respuestas de organismos y sociedades científicas tanto nacionales como internacionales, para lograr establecer diferentes estrategias de control y poner en marcha iniciativas encaminadas a fomentar el desarrollo de nuevos antibióticos y frenar así el avance de las resistencias antimicrobianas en los diferentes entornos. Así, en 1995 la *American Society for Microbiology* (ASM) propuso una serie de medidas para controlar la diseminación de las resistencias a antibióticos en su informe *Report of the ASM task force on antibiotic resistance*, dirigidas principalmente a poblaciones del entorno hospitalario (ASM, 1995). Una conferencia organizada por la OMS en 1997 dio lugar a la formación del *Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance* (ESGARS) (Cornaglia et al., 2004). Posteriormente, el ECDC llevó a cabo la fundación del *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS), actualmente EARS-NET, una red internacional de sistemas nacionales de vigilancia, cuyo objetivo es intentar controlar la diseminación y la selección de las resistencias a antimicrobianos (<https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>). Dentro de las campañas que promueven, se instauró el 18 de noviembre como el “Día Europeo para el Uso Prudente de los Antibióticos” (Earnshaw et al., 2014). Años después, la *Infectious Diseases Societies of America* (IDSA) publicó en 2014 un informe (Stevens et al., 2014) en el que se alertaba de una crisis añadida a esta problemática: el declive en el desarrollo e investigación de nuevos agentes antimicrobianos. Finalmente, la OMS publicó en 2014 su primer informe mundial sobre la resistencia a los antibióticos con datos de 114 países, en donde se ponía de manifiesto la grave amenaza que suponía para la salud pública este problema (WHO, 2014). Este informe señaló la necesidad de abordar el estudio de las resistencias

a antibióticos desde un enfoque global: “En ausencia de medidas urgentes y coordinadas por parte de muchos interesados directos, el mundo está aproximándose a una era post-antibiótica en la que infecciones comunes y lesiones menores que han sido tratadas durante siglos, volverán a ser potencialmente mortales. Por ello, si no tomamos medidas importantes para mejorar la prevención de estas infecciones y no cambiamos nuestra forma de utilizar los antibióticos, el mundo sufrirá una pérdida progresiva y las repercusiones serán devastadoras”.

De esta manera, se implementaron lo que hoy conocemos como planes de resistencias antimicrobianas, propuestos por la OMS y desarrollados en los países por distintas organizaciones, como la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en el caso de España. Estos planes se detallan a continuación y se engloban dentro del marco de la iniciativa *One Health*.

5.1 Iniciativa *One Health*

El concepto *One Health* que significa “una única salud”, fue introducido al comienzo de la década del 2000. La idea de fondo se conocía desde hace más de un siglo y se resume en que todo lo que afecta a la salud está conectado: la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a la salud de los ecosistemas en los que existen (<https://onehealthinitiative.com/>). Esta idea surgió con el objetivo de establecer una estrategia que permita mejorar las colaboraciones y comunicaciones entre los distintos ámbitos de investigación, para expandir así el conocimiento científico y mejorar por tanto la salud humana (Figura I.10). En este sentido, la iniciativa *One Health* señala la importancia de estudiar la resistencia a los antibióticos en un marco multidisciplinar, con un enfoque global colaborativo para comprender los riesgos para la salud humana, animal y la salud del ecosistema en su conjunto.



Figura I.10. Iniciativa *One Health* (<https://www.isglobal.org/>)

Tal como señala López-Goñi (2020), la globalización, el cambio climático y en definitiva el comportamiento humano, están multiplicando las oportunidades para que los patógenos colonicen nuevos territorios y evolucionen hacia nuevas formas más virulentas para el ser humano. Hoy en día sabemos que un 75% de las enfermedades humanas emergentes son de origen animal, como la rabia, la gripe, el ébola, la brucelosis o la reciente pandemia de COVID-19 (Rodríguez-Ferri, 2020), por lo que controlar muchas de estas enfermedades en humanos requiere su control anterior en animales. Por ello, es vital que los veterinarios tengan un papel protagonista en salud pública, porque, en definitiva, la salud de las personas depende de la salud de los animales. Así pues, se calcula que el 80% de la producción mundial de antibióticos se destina a uso agrícola y ganadero. De esta manera los animales y las plantas sirven como reservorio de estas bacterias resistentes, que a su vez intercambian genes de resistencia entre ellas a gran velocidad (Pérez-Rodríguez and Mercanoglu Taban, 2019).

De ahí que una aproximación del tipo *One Health* es la única estrategia que puede llegar a evitar que la resistencia a los antibióticos acabe siendo una pandemia en el siglo XXI.

5.2 Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, propuesto por la OMS.

Como ya se ha comentado anteriormente, la OMS estableció un plan de acción mundial con el fin de combatir la proliferación de la resistencia a los antimicrobianos y la morbi-mortalidad asociada a ella (WHO, 2015). Para ello se fijaron cinco objetivos específicos que se detallan a continuación:

1. Mejorar el conocimiento de la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y formación efectivas y la concienciación al respecto.
2. Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación. Aquí se incluyen importantes carencias a subsanar como:
 - a. Información sobre la incidencia, prevalencia de los distintos patógenos y las pautas geográficas de resistencia a antibióticos.
 - b. Conocimiento de aparición y propagación de resistencia y circulación de ésta entre los seres humanos y animales y de unos a otros, a través de alimentos aguas y medio ambiente.
 - c. Capacidad de caracterizar con rapidez la resistencia mediante medios de vigilancia y diagnóstico.
 - d. Estudios básicos de investigación que sirvan de apoyo a la búsqueda de nuevos tratamientos, métodos de diagnóstico y vacunas.
 - e. Investigación para desarrollar alternativas a los usos no terapéuticos de antimicrobianos en agricultura y ganadería.

- f. Investigación económica mediante elaboración de modelos que evalúen el costo de la resistencia a los antimicrobianos.
3. Reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de la infección.
4. Utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal.
5. Preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

Posteriormente, en junio del 2017 publicaron un plan más específico sobre Resistencia a los Antibióticos (WHO, 2017b). Se estableció el marco global para una acción más amplia destinada a reducir la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos y a incrementar, dentro y fuera de la UE, la investigación y la disponibilidad de nuevos antibióticos.

5.3 Plan nacional de resistencia a antibióticos (PRAN)

De la misma manera, en España, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, en colaboración con seis ministerios (Sanidad, Agricultura, Economía, Interior, Defensa y Educación) y con todas las comunidades autónomas, implantó en el año 2014 el “Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos (PRAN)” (AEMPS, 2014). Este plan se estructuró en torno a seis áreas prioritarias comunes para la sanidad humana y animal, que se muestran de forma esquemática en la Figura I.11. A su vez, cada una

de estas líneas estratégicas se subdividió en diferentes medidas, y éstas, en distintas acciones concretas.



Figura I.11. Áreas prioritarias del PRAN propuesto por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS, 2014).

A continuación, se desarrolla de una manera más detallada cada una de las líneas estratégicas de dicho plan:

- 1. Vigilancia del consumo y de la resistencia a los antibióticos.** Esta estrategia está dirigida a afianzar y establecer unas redes solidas de vigilancia, mejorar el conocimiento sobre el uso y consumo de antibióticos y el desarrollo de la resistencia a los mismos. Para ello se propusieron las siguientes medidas:
 - a. Monitorizar el consumo de antibióticos.
 - b. Mejorar la vigilancia de la resistencia a antibióticos.
 - c. Controlar el uso de antibióticos críticos.
 - d. Participar en proyectos europeos e internacionales para intercambiar información.
- 2. Control de las resistencias bacterianas.** Esta línea busca potenciar el conocimiento, la aplicación y el uso de las recomendaciones nacionales e

internacionales para el control de la resistencia a los antibióticos. Las cuatro grandes medidas que se incluyen en dicha línea son:

- a. Controlar la difusión de resistencia.
- b. Diseñar y difundir herramientas para la promoción de las buenas prácticas de uso de antibióticos.
- c. Elaborar directrices para la prescripción excepcional de antibióticos.
- d. Limitar el uso profiláctico de antibióticos a casos con necesidades clínicas definidas.

3. Identificar e impulsar medidas alternativas y/o complementarias de prevención y tratamiento. Dentro de esta línea se incluye la necesidad de acciones de investigación para desarrollar nuevas soluciones que ayuden a combatir estas enfermedades infecciosas. De esta manera se incluye:

- a. Fomentar la mejora de las medidas de higiene, manejo y bienestar animal.
- b. Promover el desarrollo y uso de pruebas de sensibilidad y métodos de diagnóstico rápido.
- c. Desarrollar recomendaciones para reducir el riesgo de infección y transmisión de organismos resistentes en el ámbito hospitalario y atención primaria.
- d. Fomentar la adopción de medidas para mejorar las condiciones de administración de los productos antiguos que contienen antibióticos no críticos.

4. Definir las prioridades en materia de investigación. Todavía es necesario mejorar el conocimiento para entender los mecanismos de acción de los antibióticos contra las bacterias, así como las causas y las consecuencias de la

aparición y propagación de las resistencias. Por ello se establecieron dos medidas concretas:

- a. Desarrollar y promover una estrategia común en materia de investigación.
- b. Desarrollo de la investigación epidemiológica y socioeconómica.

5. Formación e información a los profesionales sanitarios. En este sentido resulta indispensable llevar a cabo una actualización del conocimiento a los profesionales sanitarios, para lo que se propone:

- a. Movilizar a los profesionales de la salud.
- b. Fomentar la formación de los profesionales de la salud.
- c. Desarrollar programas de formación continuada de los profesionales de la salud con criterios de homogeneidad, en aquellas materias relacionadas con la resistencia a antibióticos.
- d. Desarrollar la autoevaluación de los prescriptores.

6. Comunicación y sensibilización de la población en su conjunto y de subgrupos de población. El objetivo es sensibilizar a los consumidores sobre los beneficios individuales y colectivos del uso racional de los antibióticos e informar sobre los riesgos de las resistencias para llevar a cabo un uso prudente de antibióticos.

El trabajo desarrollado hasta el año 2018 ha cumplido con los objetivos señalados en cada una de estas líneas estratégicas del PRAN. Los logros alcanzados han constituido avances muy significativos que permitirán reforzar y ampliar la iniciativa frente al problema de la resistencia en España. En el ámbito de la salud humana, se ha mejorado el sistema de vigilancia del consumo de antibióticos, aprobándose el Sistema

Nacional de Vigilancia de Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria (IRAS) y se han consensado los indicadores para la vigilancia del consumo que facilitan la monitorización de los datos nacionales. Además, se está trabajando para llevar a cabo la implementación de los Programas de Optimización de Uso de los Antibióticos (PROA) tanto en hospitales como en Atención Primaria. En general, el consumo total de antibióticos en el ámbito de la salud humana confirmó una tendencia decreciente en los últimos años, aunque todavía España continúa entre los países que más antibióticos consumen de la UE. En el caso de la sanidad animal, se ha mejorado el sistema nacional de recogida de datos de ventas de antibióticos de uso veterinario, y se han puesto en marcha los Programas REDUCE en distintos sectores ganaderos. En este contexto, el acuerdo para la reducción del uso de colistina en porcino ha conseguido una reducción del consumo de este antibiótico del 97,18 % y en avicultura se ha reducido un 71% el consumo total de antibióticos en los últimos años (AEMPS, 2019a).

El nuevo PRAN 2019-2021 (AEMPS, 2019b) dará continuidad a los trabajos desarrollados en la primera iniciativa con el objetivo general de reducir o, al menos, frenar el crecimiento de la resistencia a los antibióticos y su impacto en la salud de toda la población. Para ello se plantean dos objetivos generales: reducir el consumo de antibióticos y disminuir la necesidad de utilizar antibióticos en medicina humana y veterinaria. Se seguirá trabajando con la misma base de las 6 líneas estratégicas desarrolladas anteriormente.

6. Medidas alternativas de tratamiento y mejora de los métodos de diagnóstico

Tal como hemos visto anteriormente y como establece el PRAN, es necesario desarrollar estrategias alternativas de tratamiento, que sean más seguras para los seres humanos y para el ganado y que a la vez sean eficaces contra los distintos patógenos

infecciosos, especialmente frente a bacterias resistentes (Singh et al., 2014; Kumar et al., 2021).

De esta manera, desde hace ya unos años hay una investigación activa encaminada a desarrollar diferentes terapias antimicrobianas. El uso de péptidos antimicrobianos (AMPs) (Cederlund et al., 2011; Sánchez-Gómez and Martínez-de-Tejada, 2017), bacteriocinas, (López et al., 2008; Kumariya et al., 2019), bacteriófagos (Pacios et al., 2020), nanobióticos como por ejemplo el uso de nanopartículas de plata (Lara et al., 2010), trasplante de microbiota fecal (FMT), probióticos y postbióticos (Fijan, 2016) o sistema CRISPR-Cas (Citorik et al., 2014; Pursey et al., 2018), son algunas de las alternativas y estrategias no convencionales que se están desarrollando hoy en día (Figura I.12). En general, todos estos avances posiblemente podrían brindar una solución alternativa o extender la vida útil de los antimicrobianos actuales.

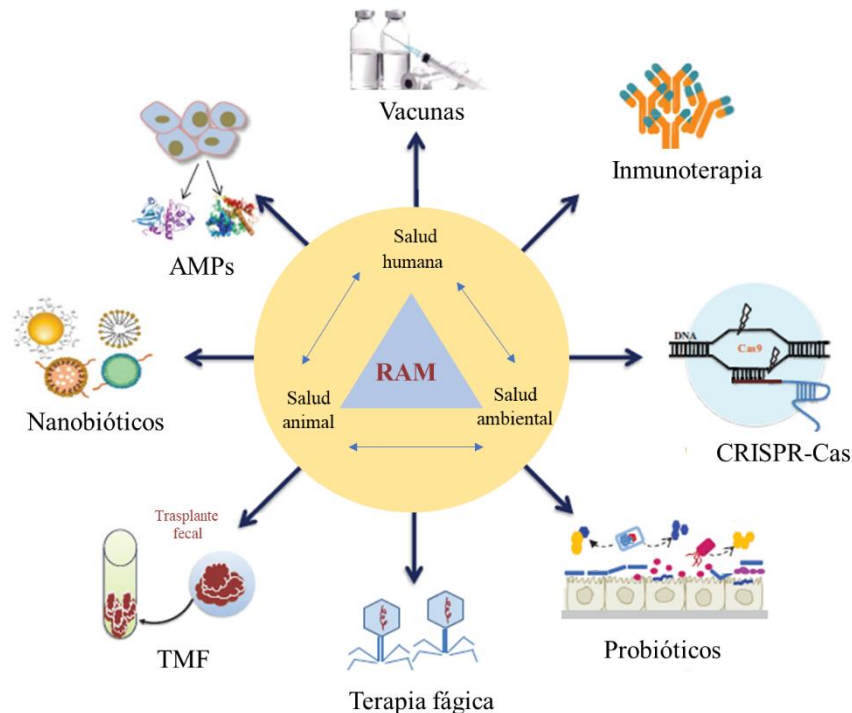


Figura I.12. Estrategias alternativas a los antibióticos para prevenir infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antimicrobianos en animales y seres humanos. TMF, trasplante de microbiota fecal. RAM, resistencia antimicrobiana. AMPs, péptidos antimicrobianos. Figura adaptada de Kumar et al. (2021).

De la misma manera, resulta necesario promover el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos, que permitan una orientación precoz sobre el tratamiento a seguir. Por ello, esta materia de investigación también es una de las prioridades que se deben seguir durante el desarrollo del PRAN.

En la actualidad, existen técnicas instrumentales que permiten determinar rápidamente el perfil de resistencias antibióticas (March-Rosselló, 2017). Entre ellas destacan las técnicas moleculares como PCRs para detectar genes BLEE, kits de PCRs a tiempo real como NucliSENS® EasyQ (bioMérieux) que detecta genes que codifican carbapenemasas del tipo KPC en 2 h (Spanu et al., 2012) o el kit Xpert®Carba-R (GeneXpert) que detecta genes que codifican KPC, VIM, IMP y OXA-48 de manera aún más rápida (1 h) (Findlay et al., 2014). Por su parte, los *microarray* nos permiten detectar varios genes de resistencia en un solo ensayo y se han comercializado varios modelos que detectan un gran número de genes que codifican diferentes betalactamasas (BLEE, AmpC y carbapenemasas) a partir de colonias aisladas previamente (Stuart et al., 2012). Métodos colorimétricos como RAPIDEC CARBA NP (bioMérieux) y Rapid CARB® (Rosco Diagnostica) para detectar resistencia a carbapenemasas (Dortet et al., 2015) también están disponibles. De la misma manera, en la actualidad hay una investigación activa encaminada al empleo de novedosas técnicas como es la espectrometría de masas utilizando el equipo MALDI-TOF (Angeletti and Ciccozzi, 2019).

En definitiva, todos estos métodos de diagnóstico están permitiendo llevar a cabo una detección de resistencias antimicrobianas de una manera mucho más rápida y eficaz. Sin embargo, todavía queda mucho recorrido por realizar para conseguir

disminuir aún más el tiempo de detección de todas las resistencias y establecer así la terapia antibiótica adecuada.

En resumen, este es el contexto en el que se ha planteado esta Tesis Doctoral, desarrollando algunas de las medidas que se recogen en el PRAN con el objetivo de abordar la problemática de las resistencias a los antibióticos desde una perspectiva global.

Hipótesis y objetivos



El incremento imparable de las resistencias antimicrobianas constituye en la actualidad un grave problema sanitario que limita las opciones terapéuticas y dificulta el diagnóstico. La presencia de bacterias multirresistentes en el entorno medioambiental (principalmente acuático) animal y humano y la facilidad de transmisión de las resistencias entre estos entornos, plantea acciones globales y desde diversos ámbitos para frenar el desarrollo de la vaticinada gran pandemia del siglo XXI. Por ello, la **hipótesis** de trabajo de esta Tesis doctoral ha sido ahondar en el conocimiento y control de las resistencias antimicrobianas desde un enfoque multidisciplinar. De esta manera, teniendo en cuenta las líneas estratégicas propuestas por el Plan Nacional de Resistencias a Antibióticos (PRAN) para luchar contra esta problemática, el objetivo general de este estudio es abordar la vigilancia, prevención, diagnóstico y tratamiento de resistencias a los antibióticos desde la perspectiva *One Health*, centrándonos especialmente en las Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Para ello, se han establecido 4 **objetivos específicos** (cada uno de ellos desarrollado en diversos capítulos):

1. **Vigilancia** de la resistencia a antibióticos en distintos entornos
 - a. Aislamiento e identificación de bacterias resistentes a las clases de antibióticos de prioridad crítica y elevada en entornos acuáticos (**Capítulo 1**).
 - b. Caracterización filogenética de cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de distintos entornos ambientales y humanos (**Capítulo 2**).
2. **Investigación:** Estudio de la **difusión** de resistencias a antibióticos β -lactámicos
 - a. Caracterización de elementos genéticos móviles (**Capítulo 3**).

- b. Caracterización de factores de virulencia y capacidad conjugativa
(**Capítulo 4**).
3. **Prevención:** Desarrollo de medidas alternativas al uso de antibióticos en producción animal
 - a. Estudio de la capacidad bactericida de nanomateriales con base plata para su inclusión como aditivo en piensos (**Capítulo 5**).
4. **Diagnóstico y tratamiento:** Desarrollo de métodos de diagnóstico rápido y alternativas de tratamiento para infecciones causadas por Enterobacterias productoras de BLEE.
 - a. Detección e identificación rápida de Enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas mediante MALDI-TOF MS (**Capítulo 6**).
 - b. Uso de péptidos derivados de lactoferricina y de bacterias lácticas para mejorar el tratamiento de infecciones causadas por *E. coli* productoras de BLEE (**Capítulo 7**).

En la Figura O.1 se muestra una representación gráfica de los cuatro objetivos y actividades específicas desarrolladas en esta Tesis doctoral.

Resultados y discusión



Objetivo 1



VIGILANCIA: Estudio de la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en entornos acuáticos y relaciones filogenéticas entre cepas de *E. coli*-BLEE aisladas de dichos entornos y otros ambientes

CONTEXTO

El informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2014 sobre la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, reveló las lagunas de conocimientos relativas a esta problemática y la necesidad de fomentar la vigilancia e investigación. Por ello, la OMS propuso en 2015 el Plan de acción mundial sobre las resistencias. Dos años más tarde publicó la lista de "patógenos prioritarios" resistentes a los antibióticos, con el fin de promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para las 12 familias de bacterias que causan infecciones graves, y a menudo mortales, debido a la resistencia adquirida a los antibióticos. En este contexto y desde el enfoque de la iniciativa *One Health*, en el objetivo 1 se propuso reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia de las principales resistencias antibióticas y de estudios filogenéticos de las principales cepas aisladas. Teniendo en cuenta el entorno acuático como un indicador de la prevalencia de resistencias antimicrobianas en el medio ambiente, en el **Capítulo 1** se ha llevado a cabo el aislamiento y caracterización de los patógenos de prioridad alta y crítica de la lista de la OMS en ríos, depuradoras y colectores del norte de España y sur de Francia (estudio realizado en el marco del proyecto INTERREG-POCTEFA EFA183/16/OUTBIOTICS). De acuerdo con los resultados obtenidos y observándose que la resistencia a antibióticos β -lactámicos continúa siendo la más extendida, en el **Capítulo 2** se realizó la caracterización filogenética de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas del entorno animal, ambiental y humano (procedentes del estudio anterior y de otros previos realizados por nuestro grupo de investigación en la misma región), con el objetivo de determinar posibles complejos clonales que actúen como marcadores del potencial riesgo de transmisión de estas bacterias resistentes entre los distintos ambientes.

Capítulo 1



Aislamiento y caracterización de bacterias multirresistentes en distintos ecosistemas acuáticos.

Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *Microorganisms* (Anexo I): Pérez-Etayo, L.; González, D.; Leiva, J.; Vitas, A.I. Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Different Aquatic Environments in the North of Spain and South of France. *Microorganisms* 2020, 8, 1425, y han sido obtenidos en el marco del proyecto EFA183/16/OUTBIOTICS. Proyecto financiado por el Programa Europeo INTERREG V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020). “Tecnologías innovadoras para diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA”

1. Introduction

One of the highest public health challenges worldwide is the increase in the number and types of antimicrobial resistances (AMR) (Blaak et al., 2015). The use and misuse of antimicrobials in human medicine is one of the main causes of this increasing problem, but inappropriate practices in intensive livestock farms have also contributed to the alarming increase in antibiotic resistant bacteria (ARB) (Kümmerer, 2004; Woolhouse, 2015). Antibiotics used in animal production with different purposes (therapeutically and prophylactically) are finally disseminated through the environment. It has been estimated that about 75% of the administered antibiotics is not absorbed by animals and is excreted via the feces or urine (Chee-Sanford et al., 2009). In this respect, García-Galán et al. (2011) reported the presence of emerging pollutants in the Ebro basin (area with intensive livestock farms), including at least eight types of antibiotics. As a consequence of the antibiotic pressure, ARB have been isolated from different sources such as farms (manure), water and meat products (Chee-Sanford et al., 2009; Ojer-Usoz et al., 2013, 2014; Jäger et al., 2018). The dissemination of AMR throughout the environment represents a risk to human health (Leonard et al., 2015; Xu et al., 2016). In particular, one of the main routes for the dissemination of ARB and resistance genes (ARGs) is the aquatic environment (Guo et al., 2013; Hembach et al., 2017). Therefore, a *One Health* approach is needed to address the problem of antimicrobial resistance. Recently, the World Health Organization (WHO) has published a list of antibiotic-resistant priority pathogens with the aim to promote research and development of new antibiotics, as one of the proposed strategies to control the problem of global resistance to antimicrobial medicines (WHO, 2017a). The list includes 12 families of bacteria that pose the greatest threat to human health, especially if they are spread throughout the environment. Among pathogens classified

as priority 1 (critical) and 2 (high), carbapenem, β -lactam, vancomycin and methicillin resistances are considered. β -lactam antibiotics have been the most extended therapeutic choice for the treatment of human and animal infections worldwide, and consequently, bacteria have developed different β -lactam resistance mechanisms, such as the production of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemases (Falagas and Karageorgopoulos, 2009). The presence of *bla* genes encoding SHV, TEM, CTX-M groups, KPC, NDM and VIM enzymes has been frequently reported in rivers of different regions over the world (Zurfluh et al., 2013; Zarfel et al., 2017). Despite methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been detected basically in clinical environments (Stryjewski and Corey, 2014; Vaz-Moreira et al., 2014), the presence of MRSA *mecA/C* in river water has been described (Porrero et al., 2014a). Regarding vancomycin resistant enterococci (VRE), although the presence of these bacteria seems to be related to small wild mammals, rabbits and birds (Lozano et al., 2015; Ahmed and Baptiste, 2018), some authors described the presence of *E. faecium* *vanA* and *vanB* in wastewater and surface waters (Lata et al., 2016; Nakipoğlu et al., 2017). Colistin has become as the last alternative in human medicine for the treatment of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria (Müller et al., 2018). Colistin sulfate is used for the control of Enterobacteriaceae infections in pig production in some countries (Guyonnet et al., 2010; Rhouma et al., 2016), contributing to the spread of colistin resistances mediated by the transferable plasmid *mcr-1* (McGann et al., 2016). In this context, it would be very interesting to search for this type of resistance in different aquatic environments, such as rivers, WWTPs and collectors.

POCTEFA 2014-2020 is the acronym in Spanish for the INTERREG V-A Spain-France-Andorra Program (<https://www.poctefa.eu/>). It is a European territorial cooperation program created to promote the sustainable development of the regions near

to the Franco-Spanish border (Navarra, Huesca, Zaragoza, Lleida, Pyrénées-Atlantiques, Hautes-Pyrénées, Orientals-Pyrénées, Haute Garonne and Ariège). This area covers a region of 115.583 km², populated by 15 million habitants, being the intensive livestock farms as the main rural economic engine (especially porcine, poultry and rabbit production). In this respect, the main objective of this study was to determine the presence of ARB in rivers, wastewater treatment plants (WWTPs) and collectors in the North of Spain and South of France (hereafter named POCTEFA area). Specifically, we focused the study on the isolation and characterization of critical and high priority resistant pathogens according to the WHO list: Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* carbapenem-resistant; Enterobacteriaceae ESBL-producing; *Enterococcus faecium* vancomycin-resistant and *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant. In addition, due to the recent interest in colistin resistances, we also included the search for Enterobacteriaceae colistin-resistant.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

The sampling was performed by trained people from the University of Zaragoza (Laboratory of Water and Environmental Health) in 40 locations from POCTEFA area including rivers, WWTPs and collectors (hospital and slaughterhouses). A total of 80 samples were collected in two seasons of 2018 (April–May and October–November). Rivers were located in France and Spain, whereas WWTPs and collectors were present in Navarra (Northern Spain; Figure 1.1). Sampling of WWTPs was performed in influent and effluent water and sampling of rivers was done upstream and downstream of the WWTP (when present). Complete information of each point, provided by the Laboratory of Water and Environmental Health of University of Zaragoza, is available in the supplementary material (Tables S1.1 and S1.2).

Samples were taken in sterile containers in accordance with ISO 19458 (ISO, 2007) and ISO 5667-3 (ISO, 2012) standards and stored at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ in the dark until they were sent to the University of Navarra. Microbiological analysis was carried out within 24 h of arrival of samples (stored at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

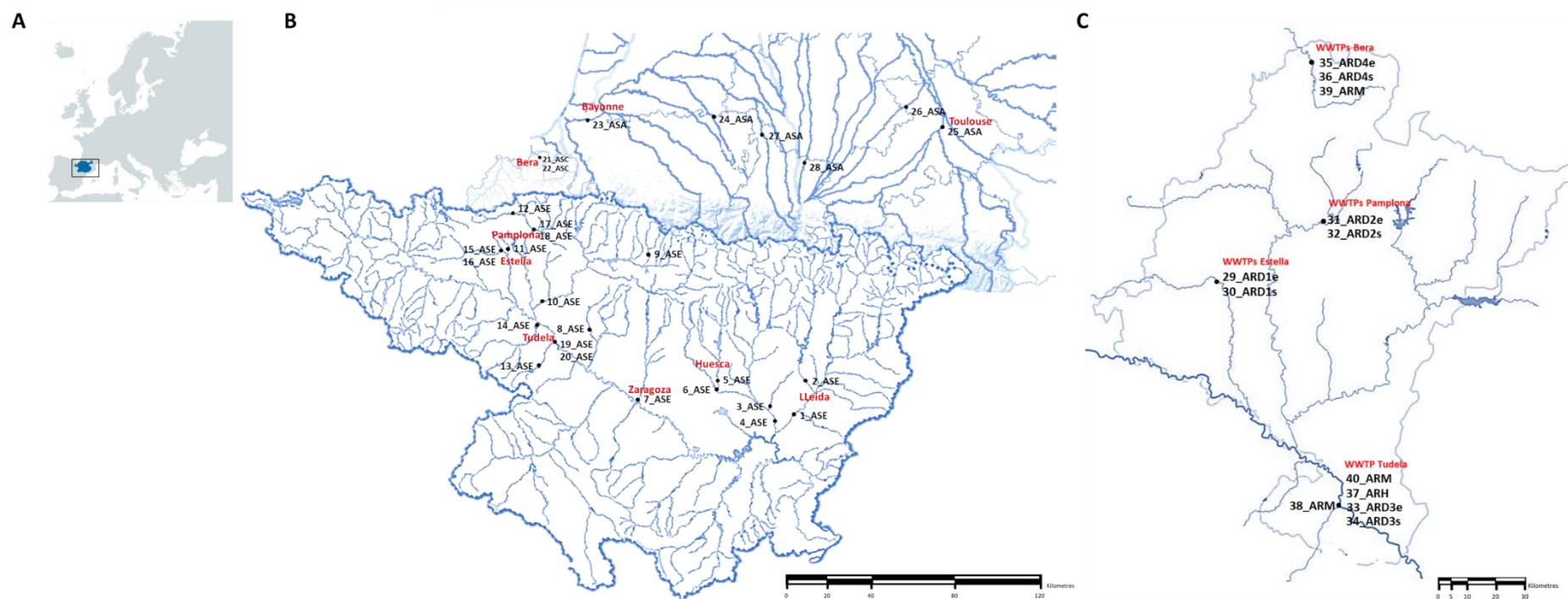


Figure 1.1. Geographical location of sampling. A: POCTEFA area (North Spain and South France). B: Sampling points of rivers (ASE: Ebro Basin; ASC: Cantabrian Basin; ASA: Adour-Garonne Basin); C: Sampling points of wastewater treatment plants (WWTPs) and collectors in the Navarra region (ARDe: Discharge of wastewater entering the treatment plant. ARDs: Discharge of wastewater leaving the treatment plant. ARH: Discharge of hospital wastewater. ARM: Discharge of slaughterhouse wastewater).

2.2. Isolation and Identification of Resistant Bacteria

In order to detect the presence of resistant bacteria (even the lethargic ones by environmental stressors such as the temperature or the lack of nutrients), two approaches were performed (Figure 1.2). In the first method, 1 mL of each sample was spread on the surface of specific selective culture media for each resistance type (described below). In the second method, two previous enrichment processes were carried out for the recovery of stressed cells. This way, 10 mL water samples were transferred to 10 mL of double concentration EE Mossel broth (Difco, Le Pont de Claix, France) and were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ during 24 h, in order to isolate Gram negative bacteria. Similarly, enrichment in Giolitti Cantoni broth (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) was performed for the recovery of Gram positive bacteria (24–48 h at $37 \pm 1^\circ\text{C}$). Following the incubation periods, isolations were performed on the selected culture media. In the case of carbapenem and colistin resistances, selective culture media was changed in the second sampling in order to improve the recovery of these strains (taking into account the obtained results in the first sampling).

Chromogenic selective plates from bioMérieux (Marcy l’Etoile, France) were used for the isolation of the target resistant bacteria. Thus, ChromID ESBL plates containing a mixture of antibiotics including cefpodoxime (CPD) were used for the isolation of suspicious ESBL-producing strains. ChromID MRSA contains ceftiofuran (FOX) as a selective agent and was used for the isolation of MRSA. ChromID VRE agar plates select vancomycin (VA) resistant *Enterococcus*, allowing the differentiation between *E. faecium* and *E. faecalis*. Finally, ChromID CARBA SMART agar plates and ChromID CARBA agar plates were used for the isolation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE; first and second sampling events, respectively). In addition, Columbia CNA and MacConkey agar supplemented with 2 $\mu\text{g/mL}$ of colistin (COL;

Oxid) were used for the isolation of colistin resistant bacteria (first and second sampling events, respectively). After the incubation at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ during 24–48 h, suspicious colonies were isolated on ChromID CPSE, nutrient agar or blood agar (bioMerieux). The identification was carried out using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS; bioMerieux) or biochemical tests (oxidase, API 20NE, API20E, APIstaph or API 20STREP; bioMerieux). Pure cultures were stored at -80°C for further characterization.

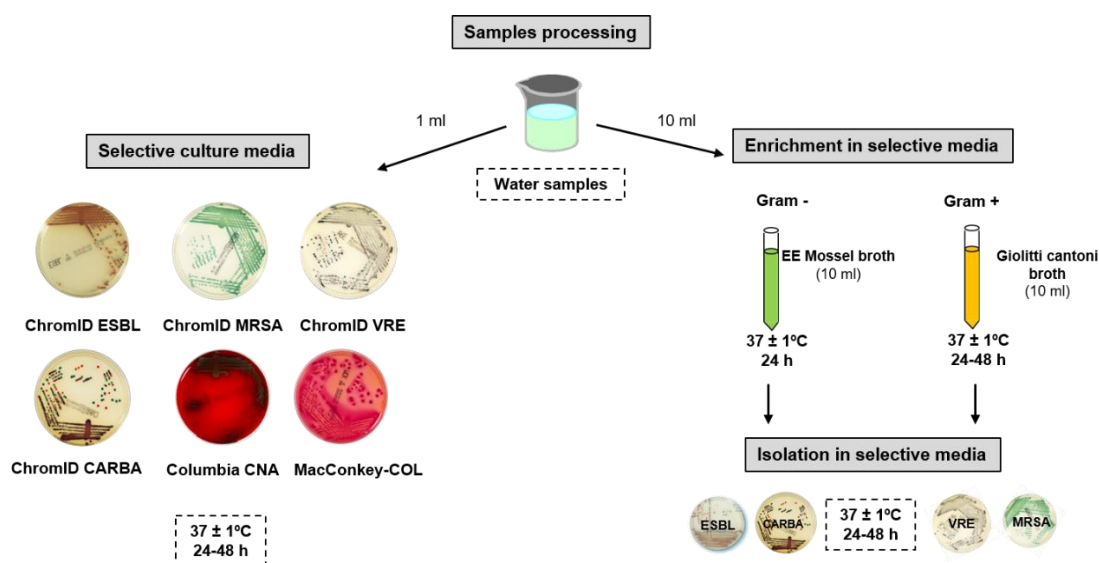


Figure 1.2. Procedure for the isolation of antibiotic resistant bacteria in water samples

2.3. Phenotypic and Genotypic Characterization of Resistant Strains

The antibiotic disks used for the phenotypic characterization were provided by Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France), ROSCO Diagnostica (Taastrup, Denmark) and by bioMerieux in the case of the E-tests. The results were interpreted according to “Clinical & Laboratory Standards Institute”, CLSI (CLSI, 2018) or “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”, EUCAST guidelines (EUCAST, 2018). The antimicrobials tested and resistance breakpoints can be found in the supplementary material (Table S1.3). The specific methodology applied for the

phenotypic and/or genotypic characterization of each types of resistance is explained in the subsequent sections.

2.3.1. ESBL-Producer Enterobacteriaceae and Other β -Lactamases

ESBL production was confirmed by the double-disk synergy test (DDST) according to Jarlier et al., (1988). Basically, the amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 30 μ g) was placed in the center of the inoculated Mueller Hinton cation-adjusted agar plate (MH; Becton Dickinson) and the following β -lactam antibiotics were placed at a distance of 20 mm: ceftazidime (CAZ, 30 μ g), ceftriaxone (CRO, 30 μ g), aztreonam (AZT, 30 μ g) and cefpodoxime (CPD, 10 μ g). After incubation at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18–24 h, the strain was considered as the ESBL-producer when the enhanced inhibition zone was observed between the cephalosporin disk and AMC, indicating synergy. AmpC β -lactamase production was determined following the methodology of Thean et al. (2009) by comparing the diameters of each β -lactam or β -lactam with an inhibitor (ceftazidime/clavulanic acid and cefotaxime/clavulanic acid) in MH and MH supplemented with cloxacillin (250 mg/L, Sigma Aldrich, Singapore). When an increased inhibition zone of >5 mm in cloxacillin plates was observed, the microorganisms was considered to be an AmpC-producer (Derbyshire et al., 2009). Finally, we studied the presence of metallo- β -lactamases (MBL) according to Arakawa et al. (2000), using CAZ (30 μ g), imipenem (IMP, 10 μ g) and EDTA (10 μ L) disks in MH plates. In addition, an IMP disk was used to which 10 μ L of EDTA was added. It was considered an MBL-producing strain when a synergistic effect was observed between the IMP, CAZ and EDTA discs and if the difference between the IMP + EDTA disc and the IMP disc was >5 mm.

The DNA extraction procedure was performed with the DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen, Barcelona, Spain), using a pretreatment protocol for Gram-negative

bacteria and following the manufacturer's instruction. The quantity and quality of the DNA was analyzed using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

The detection of AmpC β -lactamases genes was performed using the multiplex-PCR assay described by Pérez-Pérez and Hanson (2002). The primers, size of the amplicons and conditions followed are summarized in Table 1.1.

Table 1.1. Primers and conditions used for the amplification of the different β -lactamases genes.

Target	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Conditions
<i>bla</i> _{MOXM}	<i>bla</i> _{MOXM} -Fw	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	Initial denaturation at 94°C for 3 min; 25 cycles of amplification: denaturation at 94°C for 30 s, hybridization at 64°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min; final elongation at 72°C for 7 min.
	<i>bla</i> _{MOXM} -Rv	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
<i>bla</i> _{CITM}	<i>bla</i> _{CITM} -Fw	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	
	<i>bla</i> _{CITM} -Rv	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
<i>bla</i> _{DHAM}	<i>bla</i> _{DHAM} -Fw	AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405	
	<i>bla</i> _{DHAM} -Rv	CCGTACGCATACTGGCTTTC		
<i>bla</i> _{ACCM}	<i>bla</i> _{ACCM} -Fw	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	
	<i>bla</i> _{ACCM} -Rv	TTCGCCGAATCATCCCTAGC		
<i>bla</i> _{EBC}	<i>bla</i> _{EBC} -Fw	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302	
	<i>bla</i> _{EBC} -Rv	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		
<i>bla</i> _{FOX}	<i>bla</i> _{FOX} -Fw	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	
	<i>bla</i> _{FOX} -Rv	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{SHV} -Fw	AGGATTGACTGCCTTTTTG	392	
	<i>bla</i> _{SHV} -Rv	ATTTGCTGATTTTCGCTCG		
<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{TEM} -Fw	ATCAGCAATAAACCAGC	516	
	<i>bla</i> _{TEM} -Rv	CCCCGAAGAACGTTTTTC		
<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{OXA} -Fw	ATATCTCTACTGTTGCATCTCC	619	
	<i>bla</i> _{OXA} -Rv	AAACCCTCAAACCATCC		
<i>bla</i> _{CTX-M1}	<i>bla</i> _{CTX-M1} -Fw	AAAAATCACTGGCCAGTTC	415	
	<i>bla</i> _{CTX-M1} -Rv	AGCTTATTCATCGCCACGTT		
<i>bla</i> _{CTX-M2}	<i>bla</i> _{CTX-M2} -Fw	CGACGCTACCCCTGCTATT	552	
	<i>bla</i> _{CTX-M2} -Rv	CCAGCGTCAGATTTTTTCAGG		
<i>bla</i> _{CTX-M9}	<i>bla</i> _{CTX-M9} -Fw	CAAAGAGAGTGCAACGGATG	205	
	<i>bla</i> _{CTX-M9} -Rv	ATTGGAAAGCGTTCATCACC		
<i>bla</i> _{CTX-M8}	<i>bla</i> _{CTX-M8} -Fw	TCGCGTTAAGCGGATGATGC	666	
<i>bla</i> _{CTX-M25}	<i>bla</i> _{CTX-M25} -Fw	GCACGATGACATTCGGG	327	
<i>bla</i> _{CTX-M8/25}	<i>bla</i> _{CTX-M1} -Rv	AACCCACGATGTGGGTAGC	666/327	

Fw: Forward, Rv: Reverse.

The identification of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA} genes was performed using the multiplex-PCR assay described by Colom et al. (2003) while a modification of the

multiplex-PCR described by Woodford et al. (2006) was used for the study of *bla*_{CTX-M} genes. The reaction mixture composition and amplification conditions for the *bla*_{CTX-M} genes were described in the manuscript of Ojer-Usoz et al. (2014). All the details for the several multiplex PCR assays are shown in Table 3.1.

A bidirectional DNA sequence analysis of the amplicons were performed by the MacroGen EZ-Seq purification service to determine the molecular types of *bla* genes (MacroGen Europe, Amsterdam, The Netherlands). Searches for DNA and protein homologies were carried out through the National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLAST program. The alignment of DNA and amino acids sequences was performed using Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.3.2. Carbapenemase-Producing Strains

Disks of ertapenem (ETP, 10 µg, Oxoid), IMP (10 µg, Oxoid) and meropenem (MER, 10 µg, Becton Dickinson) were used to determine carbapenemase production. In addition to the screening of the presence of β-lactamase and metallo-β-lactamase (described above), OXA-48-like, KPC, NDM and VIM type carbapenemases were determined using the immunochromatography test Resist-4 O.K.N (Coris Bioconcept, Gembloux, Belgium), according to the manufacturer instructions.

2.3.3. Colistin Resistant Enterobacteriaceae

COL E-test (bioMerieux) was performed for the determination of this resistance, using EUCAST guidelines (EUCAST, 2018) for the interpretation of the inhibition zone (Table S1.3). The presence of *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* genes was detected by conventional PCRs using the specific primers and conditions shown in Table 1.2 and following the conditions described in the corresponding works (Liu et al., 2016; Xavier et al., 2016; Borowiak et al., 2017; Carattoli et al., 2017; Wenjuan et al., 2017).

Table 1.2. Primers and conditions used for the amplification of the *mcr* genes.

Target	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Conditions
<i>mcr-1</i>	<i>mcr-1</i> -Fw	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	309	20 cycles of amplification at 94°C for 30 s, 58°C for 90 s 72°C for 1 min and final 72°C for 10 min
	<i>mcr-1</i> -Rv	CTGGTCCGGTCTGTAGGG		
<i>mcr-2</i>	<i>mcr-2</i> -Fw	TGTGCTTGTGCCGATTGGA	567	33 cycles of amplification at 95°C for 3 min, 65°C for 30 s, 72°C for 1 min and final 72°C for 10 min.
	<i>mcr-2</i> -Rv	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG		
<i>mcr-3</i>	<i>mcr-3</i> -Fw	TTGGCACTGTATTTTGCATTT	542	30 cycles of amplification at 95°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 45 s and final 72°C for 7 min.
	<i>mcr-3</i> -Rv	TTAACGAAATTGGCTGGAACA		
<i>mcr-4</i>	<i>mcr-4</i> -Fw	ATTGGGATAGTCGCCITTTT	487	20 cycles of amplification at 94°C for 30 s, 58°C for 90 s, 72°C for 1 min and final 72°C for 10 min
	<i>mcr-4</i> -Rv	TTACAGCCAGAATCATTATCA		
<i>mcr-5</i>	<i>mcr-5</i> -Fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644	30 cycles of amplification at 95°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 95 s and final 72°C for 5 min.
	<i>mcr-5</i> -Rv	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG		

Fw: Forward, Rv: Reverse

2.3.4. Methicillin Resistant Strains

Methicillin resistances were confirmed by using FOX disks (30 µg, Becton Dickinson). For the determination of gene *mecA*, the Alere™ PBP2a test was performed according to the manufacturer instructions (Abbot, Scarborough, Maine). This is a rapid qualitative immunochromatographic analysis for the detection of penicillin 2a binding protein (encoded by *mecA*).

2.3.5. Vancomycin Resistant Strains

The VA resistance of *E. faecium* was confirmed by the E-test (bioMerieux), in Mueller Hinton Agar with 5% sheep blood (bioMerieux). Additional E-test of teicoplanin (TEC; bioMerieux) was performed in positive strains in order to determine the presence of gene *vanA* or *vanB*. Strains with the *vanA* phenotype are characterized by a high level of resistance to both VA (MIC ≥ 64 µg/mL) and TEC (MIC ≥ 16 µg/mL). However, strains carrying the *vanB* gene are characterized by variable levels of resistance to VA (MIC between 4 and ≥ 1000 µg/mL) and sensitivity to TEC (Ahmed and Baptiste, 2018).

2.4. Antimicrobial Resistance Patterns

The antimicrobial susceptibility of resistant strains to additional antibiotics was obtained in the MicroScan® system (Siemens AG, Munich, Germany). NM37, PN28

and Neg Multidrug Resistant MIC 1 panels (Siemens AG, Germany) were used in combination with Lab Pro® 3.5 software for determining the minimum inhibitory concentrations (MICs). The panels included the following antimicrobials: AMC, ampicillin (AMP), ampicillin-sulbactam (AMS), azithromycin (AZI), AZT, cefazolin (CZ), cefepime (FEP), CAZ, cefuroxime (CXM), CPD, cefotaxime (CTX), FOX, chloramphenicol (CHL), ciprofloxacin (CIP), COL, clindamycin (Cd), daptomycin (DAP), ETP, erythromycin (ERY), fosfomicin (FOT), fusidic acid (FA), gentamicin (GM), IMP, levofloxacin (LV), linezolid (Lz), MER, mupirocin (MUP), moxifloxacin (MXF), mezlocillin (MZ), norfloxacin (NOR), nitrofurantoin (FD), oxacillin (OX), penicillin (P), piperacillin (PIP), piperacillin-tazobactam (TZP), rifampicin (RA), synergid (SYN), tobramycin (TO), tetracycline (TET), tigecycline (TIG), TEC, trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and vancomycin (VA).

This automated method provided very interesting results for the study of ESBL-producing bacteria. ESBL production was confirmed when a > 3 two-fold concentration decrease occurred in an MIC for any of β -lactams tested in combination with clavulanic acid versus its MIC when tested alone (Komatsu et al., 2003; Ojer-Usoz et al., 2014). The MIC₅₀ and MIC₉₀ (minimum concentration required to inhibit the growth of 50% and 90% of organisms, respectively) were used to evaluate antibiotic sensitivities. Multi-drug resistances (MDR) and extensive MDR were considered when resistances to three or at least five antimicrobial agents were detected, respectively (Magiorakos et al., 2012).

2.5. Statistical Analysis

The results for the rates of resistances to antibiotics were subjected to statistical processing with the SPSS 15 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), applying the Chi-square (X^2) test with a level of significance of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Prevalence of Resistant Bacteria in Rivers and Sewage Waters

Table 1.3 shows the positive samples (in red) regarding antibiotic resistances in both sampling events. In relation to rivers (samples 1–28), 96.4% were carriers of antibiotic resistant bacteria for at least one of the selected family types, being only one river in the Ebro basin (9_ASE) negative in both samplings. However, a lower prevalence of positive samples was detected in the Adour-Garonne Basin (samples 23 to 28), and COL resistances were not detected in the French area.

As shown in Table 1.4, the prevalence was similar in both sampling events (with the exception of carbapenem and COL, $p < 0.05$), the resistances to CPD and FOX being the prevalent ones. Changes in the methodology for a better isolation of COL and carbapenem resistant bacteria may be the cause of the increase of positive samples for these antibiotics in the second sampling.

Table 1.3 Isolation of resistant bacteria in selective culture media (red: presence; green: absence). 1st SE, 2nd SE: first and second sampling events; ASE: Ebro Basin; ASC: Cantabrian Basin; ASA: Adour- Garonne Basin; ARDe: Discharge of wastewater entering the treatment plant; ARDs: Discharge of wastewater leaving the treatment plant; ARH: Discharge of hospital wastewater; ARM: Discharge of slaughterhouse wastewater; CPD (Cefpodoxime); FOX (Cefoxitin); VA (Vancomycin); CARB (Carbapenem); COL (Colistin).

Sample point	CPD 1 st SE	CPD 2 nd SE	FOX 1 st SE	FOX 2 nd SE	VA 1 st SE	VA 2 nd SE	CARB 1 st SE	CARB 2 nd SE	COL 1 st SE	COL 2 nd SE
1_ASE	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Red
2_ASE	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Green
3_ASE	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red
4_ASE	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green
5_ASE	Red	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red
6_ASE	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red
7_ASE	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Red
8_ASE	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green
9_ASE	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
10_ASE	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green
11_ASE	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Red
12_ASE	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red
13_ASE	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red
14_ASE	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Red
15_ASE	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red
16_ASE	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green
17_ASE	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Red
18_ASE	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Red
19_ASE	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Green
20_ASE	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red
21_ASC	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Red
22_ASC	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Red
23_ASA	Green	Green	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green
24_ASA	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green
25_ASA	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green
26_ASA	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green
27_ASA	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green
28_ASA	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green
29_ARD1e	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Red
30_ARD1s	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
31_ARD2e	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green
32_ARD2s	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Red
33_ARD3e	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red
34_ARD3s	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green
35_ARD4e	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Red
36_ARD4s	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green
37_ARH	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green
38_ARM	Red	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red
39_ARM	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Red
40_ARM	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Red

Table 1.4. Percentage of positive rivers and WWTPs and collectors for each antibiotic in both sampling events and the number of resistant strains isolated.

Antimicrobial resistance	% Positive rivers		% Positive WWTP/C		N total isolates		N of confirmed target ARB (%)		Target ARB
	1 st SE	2 nd SE	1 st SE	2 nd SE	Rivers	WWTP/C	Rivers	WWTP/C	
Cefpodoxime	75	50	83.3	100	45	25	18 (40)	19 (75)	ESBL Enterobacteriaceae
Cefoxitin	71.4	75	83.3	100	89	39	2 (2.3)	0	<i>S. aureus</i> MRSA
Carbapenems	32.1	92.8 ^a	41.6	91.6 ^a	50	27	0	0	<i>A.baumannii</i>
Vancomycin	42.9	32.1	75	91.6	8	15	1 (12.5)	4 (26.6)	<i>P. aeruginosa</i> Enterobacteriaceae
Colistin	3.6	53.6 ^b	8.3	66.6 ^b	8	5	2 (25)	2 (40)	<i>E. faecium</i> Enterobacteriaceae
Total					200	111	23 (11.5)	32 (28.9)	

^a and ^b are the statistically significant differences ($p < 0.05$) between the 1st and 2nd sampling events (SE); WWTP/C: wastewater treatment plant and collectors; Target ARB: antibiotic resistant bacteria included in the list of high and critical priority pathogens of WHO.

Regarding WWTP and collectors, 100% of the samples were positive for at least one type of resistance in both samplings and no differences were observed ($p > 0.05$) between the influent and effluent water in the treatment plants (Table 1.3). It must be noticed that the greatest variety and number of target resistant bacteria were isolated from wastewaters ($n=32$, 28.9%). In this way, all target carbapenem resistant pathogens ($n=7$) and the majority (80%) of *E. faecium* resistant to VA were isolated from samples of influent water of sewage treatment plants and collectors, while no MRSA was detected (Table 1.4).

From the total of 440 strains isolated in selective media, 311 (70.7%) were confirmed as resistant by the aforementioned phenotypic methods (Figure 1.3).

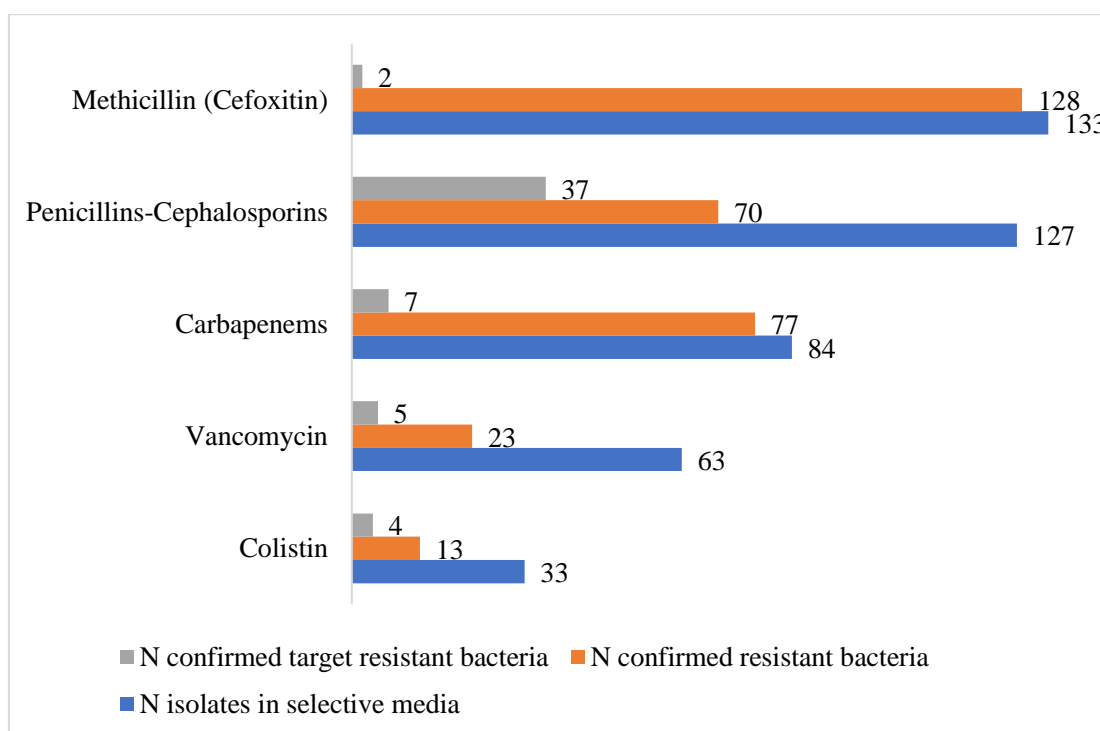


Figure 1.3. Total number of resistant strains isolated from water samples in the POCTEFA area.

In general, penicillin and cephalosporin resistances were the most extended ones (63.7%), followed by carbapenem resistances (24.7%) and a lower prevalence of VA and COL resistances was detected (7.4% and 4.2%, respectively). Due to the large number of environmental strains isolated with innate resistance to these groups of

antibiotics (mainly penicillin resistance), only 17.7% ($n=55$) of the isolates were identified as target priority pathogens (with acquired resistance), with a high presence of ESBL-producers (52.8% $n=37$). The majority of isolates of this target group were identified as *E. coli* (62%) followed by *Serratia* (Figure 1.4A). Similarly, only 2 out of 128 isolates resistant to FOX (1.6%) were confirmed as MRSA. Regarding carbapenemase-producing isolates 7 out of 77 (9%) corresponded to the list of priority pathogens (*P. aeruginosa* and Enterobacteriaceae) and no *A. baumannii* was isolated (Figure 1.4B). In addition, 4 out of the 13 COL resistant Enterobacteriaceae (30.8%) were identified, *E. coli* being the prevalent one (Figure 1.4C). Finally, five *E. faecium* (21.7%) were identified from the total of 23 VA resistant isolates.

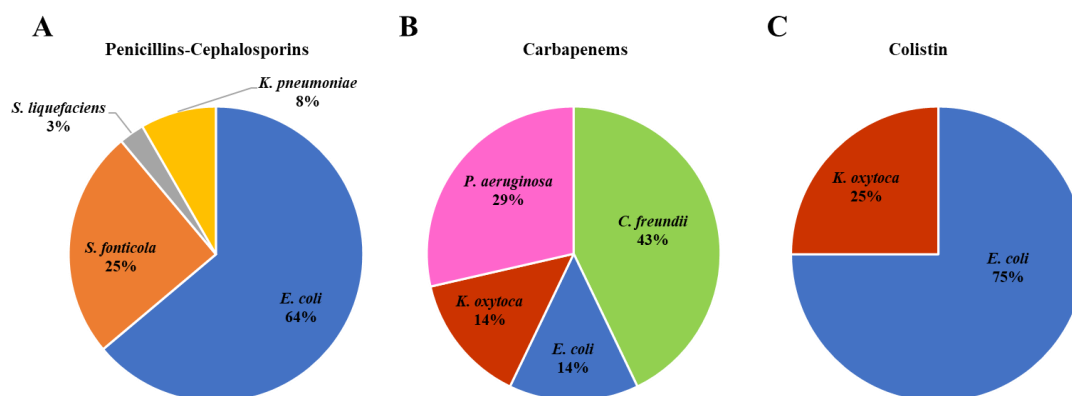


Figure 1.4. Genus distribution of isolated Gram negative target resistant bacteria. A) Penicillins-Cephalosporins; B) Carbapenems and C) Colistin.

3.2. Characteristics of the Target Isolated Pathogens

A summary of the antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance genes (ARG) of the 48 target Gram negative isolates is presented in Table 1.5.

Table 1.5. Characteristics and antibiotic resistance profile of isolated Gram negative bacteria.

N° strain	Samples Code	Species	Resistance genes	Antimicrobial resistance											
				AmpC	Penicillins	Cephalosporins	Monobactams	β-lactamase inhibitors	Carbapenems	Aminoglycosides	Quinolones	Tetracyclines	Others	MDR	Extensive MDR
1	3_ASE	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M14	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMS	-	GM, TO	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT, CHL	+	+
2	3_ASE	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M14	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS	-	GM, TO	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT, CHL	+	+
3	4_ASE	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M14	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS	-	GM, TO	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT, CHL	+	+
4	6_ASE	<i>E. coli</i>	CTX-M15	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS	MER	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET, TIG	SXT, CHL	+	+
5	8_ASE	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M14	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	-	+	+
6	17_ASE	<i>E. coli</i>	CTX-M1	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	TET	CHL	+	+
7	17_ASE	<i>E. coli</i>	CTX-M1	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	TET	CHL	+	+
8	29_ARD1e	<i>E. coli</i>	CTX-M1	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	TET	-	+	+
9	30_ARD1s	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M14	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	-	+	-
10	30_ARD1s	<i>E. coli</i>	CTX-M14	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMS	-	-	-	-	SXT, FOT	+	+
11	31_ARD2e	<i>E. coli</i>	CTX-M15	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	-	SXT	+	-
12	32_ARD2s	<i>E. coli</i>	CTX-M1, SHV-12	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	CHL	+	+
13	32_ARD2s	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M1, SHV-12	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, CHL	+	+
14	33_ARD3e	<i>E. coli</i>	TEM-171, CTX-M1	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	-	-	+	-
15	34_ARD3s	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M14	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	-	AMS	-	GM, TO	-	TET	SXT	+	+
16	34_ARD3s	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M14	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	-	AMS	-	GM, TO	-	TET	SXT	+	+
17	35_ARD4e	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M1	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	GM, TO	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT	+	+
18	7_ASE	<i>E. coli</i>	TEML-278, SHV-12	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	TET	-	+	-
19	30_ARD1s	<i>E. coli</i>	TEM-171, CTX-M15	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	TET	-	+	-
20	32_ARD2s	<i>E. coli</i>	TEML-278, CTX-M15	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS	-	-	-	-	FOT	+	+
21	35_ARD4e	<i>E. coli</i>	TEM-176, CTX-M15, CTX-M14	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	36_ARD4s	<i>E. coli</i>	OXA-1, CTX-M15	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS	-	TO	LV, CIP, MXF, NOR	-	SXT	+	+
23	40_ARM	<i>E. coli</i>	CTX-M15	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, CHL	+	+
24	7_ASE	<i>S. fonticola</i>	CTX-M1	+	AMP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ	AZT	AMC	-	-	-	-	-	+	-
25	11_ASE	<i>S. fonticola</i>	-	+	AMP	CZ, CXM, CPD, CTX	-	AMC	-	-	-	-	-	+	-
26	11_ASE	<i>S. fonticola</i>	CTX-M1	+	AMP	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ	AZT	AMC, AMS	-	-	-	-	-	+	-
27	11_ASE	<i>S. fonticola</i>	CTX-M15	+	AMP, PIP	CZ, CXM, CPD, CTX	-	AMC, AMS	-	-	MXF	-	FOT	+	+
28	20_ASE	<i>S. fonticola</i>	-	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ	AZT	AMC, AMS	-	-	-	-	-	+	-
29	3_ASE	<i>S. fonticola</i>	TEM-171	+	AMP	CZ, CXM, CPD, CTX	-	AMC	ETP	-	-	-	-	+	-
30	5_ASE	<i>S. fonticola</i>	TEM-171, ACC	+	AMP, PIP	CZ, CXM, CPD, CTX	-	AMC, AMS, TZP	-	-	-	-	-	+	-
31	11_ASE	<i>S. fonticola</i>	TEM-171	+	AMP	CZ, CXM, CPD, CTX	-	AMC	-	-	-	-	-	+	-
32	39_ARM	<i>S. fonticola</i>	CTX-M15, ACC	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX	AZT	AMC, AMS	-	-	-	-	COL	+	+
33	8_ASE	<i>S. liquefaciens</i>	-	+	AMP	CZ, CXM, CPD	-	AMC	-	-	-	-	-	+	-
34	33_ARD3e	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-171, SHV-12, CTX-M1, DHA	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS	MER	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT, CHL	+	+
35	35_ARD4e	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M14	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	MER	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT, CHL	+	+

Table 1.5. Cont.

N° strain	Samples Code	Species	Resistance genes	Antimicrobial resistance												
				AmpC	Penicillins	Cephalosporins	Monobactams	β-lactamase inhibitors	Carbapenems	Aminoglycosides	Quinolones	Tetracyclines	Others	MDR	Extensive MDR	
36	35_ARD4e	<i>K. pneumoniae</i>	TEML-278, SHV-12, OXA-1, CTX-M15	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS	-	TO	LV, CIP, MXF, NOR	-	SXT, CHL	+	+	
37	11_ASE	<i>K. oxytoca</i>	-	+	AMP	CZ, FOX, FEP	AZT	AMC	-	-	-	-	-	-	+	-
38	33_ARD3e	<i>E. coli</i>	TEML-278, KPC	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	ETP, MER, IMP	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	SXT, FOT	+	+	
39	33_ARD3e	<i>K. oxytoca</i>	TEML-278, KPC	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	ETP, MER, IMP	TO	LV, CIP, MXF, NOR	-	SXT, FOT	+	+	
40	36_ARD4s	<i>C. freundii</i>	CTX-M1	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	-	AMC, AMS, TZP	IMP	-	MXF	-	SXT	+	+	
41	33_ARD3e	<i>C. freundii</i>	TEML-278,EBC, DHA, KPC	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	ETP, MER, IMP	GM, TO	MXF	-	FOT	+	+	
42	39_ARM	<i>C. freundii</i>	TEML-278, EBC, KPC	+	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	ETP, MER, IMP	GM, TO	NOR	-	FOT	+	+	
43	33_ARD3e	<i>P. aeruginosa</i>	TEML-278	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS	MER, IMP	AM, GM, 1LV, CIP, NOR	-	TET	SXT, FOT, CHL	+	+	
44	29_ARD1e	<i>P. aeruginosa</i>	-	+	AMP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, FOX	-	AMC, AMS	ETP, MER, IMP	-	-	-	TET	SXT, FOT, CHL	+	+
45	22_ASC	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	COL	-	-
46	39_ARM	<i>E. coli</i>	CTX-M15	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	-	-	-	-	-	COL, FOT	+	+
47	40_ARM	<i>E. coli</i>	<i>mcr-1</i>	-	-	-	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	COL, SXT	+	-	
48	1_ASE	<i>K. oxytoca</i>	-	-	AMP	-	-	-	-	-	-	-	COL, FOT	+	-	

AMP, ampicillin; PIP, piperacillin; MZ, mezlocillin; CZ, cefazolin; CXM, cefuroxime; CPD, cefpodoxime; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FOX, ceftoxitin; FEP, cefepime; AZT, aztreonam; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; AMS, ampicillin-sulbactam; TZP, piperacillin-tazobactam; ETP,ertapenem; MER, meropenem; IMP, imipenem; GM, gentamicin; TO, tobramycin; LV, levofloxacin; CIP, ciprofloxacin; MXF, moxifloxacin; NOR, norfloxacin; TET, tetracycline; TIG, tigecycline; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; COL, colistin; FOT, fosfomicin; CHL, chloramphenicol.

ESBL production was confirmed by the double-disk synergy test (DDST) and MicroScan® system in a 93.7% ($n=45$) of the strains. However, the presence of *bla* genes was confirmed by PCR and sequencing in 88.9% ($n=40$) of them. This could be probably related with the higher specificity of these genotypic methods in *E. coli* strains compared to other species (*Serratia*, *Klebsiella* or *Pseudomonas*). Regarding the incidence of *bla* genes, the prevalent one was *bla*_{CTX-M} (80%), followed by *bla*_{TEM} (60%), *bla*_{SHV-12} (12.5%) and *bla*_{OXA-1} (5%; Figure 1.5). The sequence analysis demonstrated that genes from CTX-M1 group (*bla*_{CTX-M1} and *bla*_{CTX-M15}) were present in 55% of ESBL-producing isolates (Figure 1.5). Regarding the CTX-M-9 group, it was present in 25% of ESBL-producing isolates and the sequences shown that all of them corresponded to the *bla*_{CTX-M-14} gene. Genes encoding for *bla*_{CTX-M9}, *bla*_{CTX-M2}, *bla*_{CTX-M8} and *bla*_{CTX-M25} were not detected. Sequence analysis demonstrates that all isolates carrying the β -lactamase TEM (Temoneira) belonged to the class TEM-1, being *bla*_{TEML-278} the prevalent one. In general, CTX-M and TEM *bla* genes were widely distributed among all the water sources, but *bla*_{SHV-12} and *bla*_{OXA-1} were mainly detected in WWTPs plants. Furthermore, 18 (45%) of the isolates had two or more *bla* genes (Table 1.5). Specifically, one of the *K. pneumoniae* strains carried four different *bla* types (*bla*_{TEML-278}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{CTX-M15}). In addition, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{SHV-12} genes were always detected together with other β -lactamase genes.

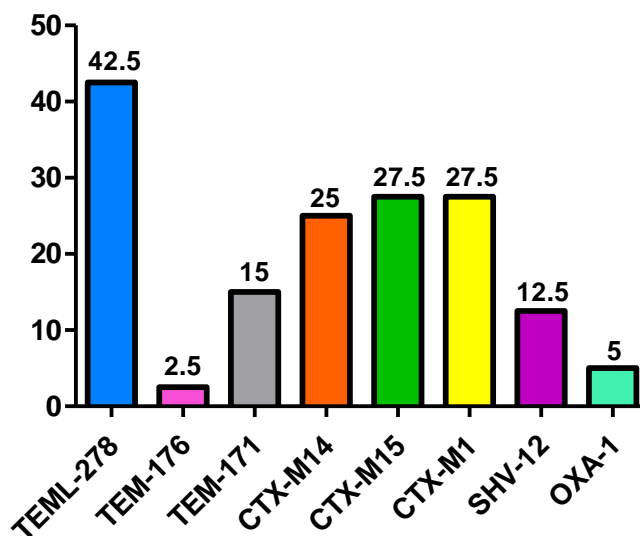


Figure 1.5. Prevalence (percentage) of β -lactamase genes in Gram negative isolates.

Otherwise, the presence of metallo- β -lactamases was not observed in any of the selected strains, while 50% of isolates ($n=24$) were confirmed as AmpC- β -lactamases-producers (Table 1.5). Nevertheless, AmpC-encoding genes (ACC, DHA and EBC) were detected in only five strains (numbers 30, 32, 34, 41 and 42 in Table 1.5). With the exception of the river isolate (number 30), the remaining four strains came from a WWTP and a duck slaughterhouse collector located in the same geographical area. Furthermore, all the strains had been characterized as carriers of other types of *bla* genes. In particular, the *K. pneumoniae* isolate number 34, contained three types of *bla* genes (*bla*_{TEM-171}, *bla*_{SHV-12} and *bla*_{CTX-M1}). Regarding carbapenemase-producing isolates, all of them were negative for carbapenemases type OXA-48, NDM and VIM. However, the presence of KPC-type carbapenemases was confirmed in four of the eleven strains (36.3%), corresponding with the strains isolated from the aforementioned WWTPs and the duck slaughterhouse collector (numbers 38, 39, 41 and 42), in which *ampC* genes were detected (Table 1.5). Furthermore, all the carbapenemase-producing bacteria were ESBL carriers, *bla*_{TEML-278} being the most extended *bla* gene (71.4%). On

the other hand, despite all Enterobacteriaceae confirmed as COL resistant by the E-test and MicroScan® system ($n=4$), the presence of the phosphoethanolamine transferase *mcr-1* gene was confirmed in only one *E. coli* (number 47 in Table 1.5) and all the strains were negative for the rest of the variants of *mcr*. This *E. coli mcr-1* was isolated from the collector of a rabbit slaughterhouse and was resistant to quinolones, tetracyclines and SXT, while it was not resistant to β -lactam antibiotics (Table 1.5). In fact, from the four COL-resistant isolates, only one strain of *E. coli* isolated from duck slaughterhouse collector (number 32) was resistant to this group of antibiotics and carried the *bla*_{CTX-M15} gene.

With respect to the target Gram positive resistant isolates ($n=7$, Table 1.6), the five strains identified as VA resistant *E. faecium* (VRE) were sensitive for TEC and considered as the *vanB* phenotype according to the recommendations (CLSI, 2018). Finally, the two MRSA isolates were negative in the Alere™ PBP2a test for checking the presence of the *mecA* gene, the most widespread genetic mechanism involved in this resistance.

Table 1.6. Characteristics and antibiotic resistance profile of isolated Gram positive bacteria.

N° strain	Samples Code	Species	Resistance genes	Antimicrobial resistance											MDR	Extensive MDR
				Penicillins	Cephalosporins	Carbapenems	Glycopeptides	Aminoglycosides	Macrolides	Quinolones	Tetracyclines	Others				
49	14_ASE	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	OX	CXM, FEP	ETP, MER	VA	GM	ERY	-	TET	FA, Cd, FOT, SYN	+	+		
50	40_ARM	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	-	CXM, FEP	-	VA	-	ERY	-	-	FA, MUP, DAP, Cd, FOT	+	+		
51	29_ARD1e	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	OX	CXM, FEP	ETP, MER	VA	GM, TO	ERY	LV, CIP, MXF	TET	FA, SXT, Cd, FOT, SYN	+	+		
52	33_ARD3e	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	P, OX	CXM, FEP	ETP, MER	VA	GM, TO	ERY	LV, CIP, MXF	TET	FA, SXT, DAP, Cd, FOT, RA, FD, SYN	+	+		
53	40_ARM	<i>E. faecium</i>	<i>vanB</i>	OX	CXM, FEP	ETP, MER	VA	GM	ERY	LV, CIP, MXF	TET	FA, SXT, Cd, FD, SYN	+	+		
54	4_ASE	<i>S. aureus</i>	-	AMP, P, OX	CXM, FOX, FEP	ETP, MER, IMP	-	-	AZI, ERY	-	-	MUP, Cd, FOT	+	+		
55	15_ASE	<i>S. aureus</i>	-	AMP, P, OX	FOX	-	VA, TEC	-	ERY	-	-	LZ, DAP, Cd, SYN	+	+		

AMP, ampicillin; P, Penicillin; OX, oxacilin; CXM, cefuroxime; FOX, cefoxitin; FEP, cefepime; ETP, ertapenem; MER, meropenem; IMP, imipenem; VA, vancomycin; TEC, teicoplanin GM, gentamicin; TO, tobramycin; AZI, azithromycin; ERY, erythromycin; LV, levofloxacin; CIP, ciprofloxacin; MXF, moxifloxacin; TET, tetracycline; FA, fusidic acid; SXT trimethoprim-sulfamethoxazole; LZ, Linezolid; MUP mupirocin; DAP, Daptomycin; Cd, clindamycin; FOT, fosfomicin; RA, rifampicin; FD, nitrofurantoin; SYN, synergid.

3.3. Multidrug Resistance Profiles

MDR (resistance to at least three antibiotics families) and extensive MDR (at least to five families) were observed in 96.4% and 67.2% of the strains respectively, with MDR being observed in 100% of the Gram positive strains (Tables 1.5 and 1.6). High levels of resistance against penicillins, cephalosporins and β -lactamase inhibitors were detected in the Gram negative isolates ($n=48$). In fact, the higher resistances were observed in AMP (95.8%), CZ (93.75%), CXM (91.6%), CPD (91.6%) and CTX (89.6%), followed by FEP (70.8%) and CAZ (66.6%). Furthermore, the majority of the isolates (77%) showed susceptibility to carbapenems (ETP, MER and IMP), despite the fact that some isolates showed MIC values in the MicroScan® close to the breaking point for IMP. With respect to monobactams, the 68.7% of strains were resistant against AZT, while more reduced resistance against tetracyclines (41.6%), CHL (29.2%) and aminoglycosides (25%) was observed. The percentage of resistance against quinolones and sulfonamides was approximately 50%. Finally, resistance to COL was the least prevalent (10.4%), with only five positive confirmed strains.

Regarding Gram positive strains ($n=7$), 100% of isolates were resistant to ERY and the majority (85.7%) were resistant to OX and fourth generation cephalosporins (FEP). Furthermore, resistance to glycopeptides, such as VA, was also prevalent (85.7%). In addition, one of the MRSA isolates was also resistant to VA and TEC, an important fact since MRSA with intermediate resistance to VA are also considered in the WHO list. Likewise, 71.4% of isolates were resistant to carbapenems, whereas the resistance against aminoglycosides (57.1% GM and 28.6% TO), tetracyclines (57.1%) and quinolones (42.9%) was lower.

The resistance rates to each individual antibiotic according to the isolates origin is represented in Figure 1.6A and B, for Gram negative and Gram positive strains,

respectively. Regarding Gram negative bacteria, strains isolated from wastewater had the highest resistance rates for AMP, CPD, CTX, FEP, MER and SXT ($p < 0.05$). Besides, significant differences were found between rivers and WWTPs for COL resistance ($p < 0.05$). In fact, very significant differences were found among WWTPs and collectors ($p = 0.0001$). Concerning Gram positive bacteria, only significant differences were found between rivers and WWTPs for CIP and SXT ($p < 0.05$).

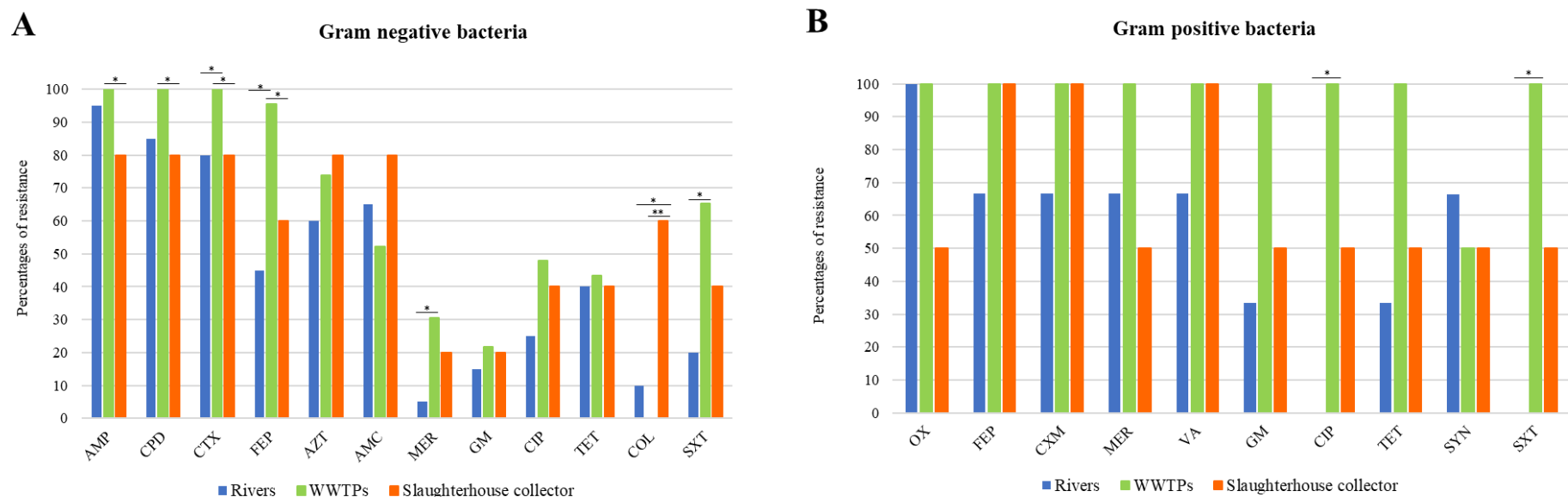


Figure 1.6. Resistance rate to each antibiotic according to the isolates origin. A) Gram negative strains and B) Gram positive strains. AMP (ampicillin); CPD (cefepodoxime); CTX (cefotaxime); FEP (cefepime); AZT (aztreonam); AMC (amoxicillin-clavulanic acid); MER (meropenem); GM (gentamicin); CIP (ciprofloxacin); TET (tetracycline); COL (colistin); SXT (trimethoprim-sulfamethoxazole); OX (oxacilin); CXM (cefuroxime); VA (vancomycin); SYN (synercid). (*, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4. Discussion

This study aimed to determine the prevalence of antibiotic resistant bacteria in aquatic environments of the POCTEFA area, a region of intensive livestock activity. The widespread presence of resistant bacteria observed in rivers, WWTPs and collectors (96.4% and 100%, respectively), highlight the impact of human activity on the spread of these resistances, especially from hospital and livestock production. In fact, 55 resistant strains identified as critical and high priority resistant pathogens (according to WHO list) were isolated in the study.

The wastewater from slaughterhouses is considered a relevant source of antimicrobial resistant bacteria and consequently may be important for its diffusion into the environment (Savin et al., 2020). The livestock pressure in most of the Spanish rivers studied in this work was high, where pig farms stood out mainly (Table S1.1). This could be the reason of the higher prevalence of resistances in the Spanish rivers than the French ones (Table 1.3). In addition, the only river free of resistant bacteria was located in the Pyrenees area (9_ASE), where no relevant cattle exploitations such as pigs, birds and rabbits were reported.

In agreement with our results, previous studies reported an increase of ESBL and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) in rivers and WWTPs, with high percentages of clinically relevant multidrug resistant bacteria and related genes (*intI1*, *sul1*, *bla_{OXA}*, *mcr-1*, *bla_{CTX-M15}*, *bla_{KPC}* and *bla_{VIM}*, among others) that were still present in effluent samples, indicating an insufficient reduction during conventional wastewater treatment (Makowska et al., 2020). In this line, our results are in agreement with previous work published by Ojer-Usoz in the same region of Navarra (Ojer-Usoz et al., 2014), with a similar prevalence of ESBL after 6 years. In addition, the association between *bla_{OXA-1}* and resistance to aminoglycosides and quinolones reported by Osińska

et al. (2016) was confirmed in the present study, because the two WWTP isolates carrying *bla*_{OXA-1} were resistant to TO, LV, CIP, MXF and NOR. Indeed, the increased quinolone resistance rate in the isolates (50%) may be caused by the use of enrofloxacin in slaughtered broiler herds (Savin et al., 2020). Furthermore, the high prevalence regarding AmpC β -lactamases could be related with the large number of *Serratia* and *Citrobacter* strains (carriers of chromosomal AmpC), even though only the specific genes in 5 strains were detected by PCR. In addition, it is interesting to keep in mind that ESBL and AmpC coproduction was detected in 19 strains, despite only five strains being confirmed as AmpC-producers by molecular methods. Moreover, two of them (numbers 39 and 42 in Table 5), were also carriers of carbapenemase gene KPC. The isolation of different KPC producing species (*E. coli*, *K. oxytoca* and *C. freundii*) in the same water sample (33_ARD3e) reinforced the hypothesis that a horizontal gene transfer is taking place between different bacterial species. Finally, in this study we did not isolate *A. baumannii* resistant to penicillins, cephalosporins or carbapenems. This could be related to the low presence of this pathogen or with methodological problems on the isolation of this species.

Colistin (polymyxin E) is currently used as a last alternative drug against MDR Gram negative bacteria. However, even resistance to this drug is increasingly being detected in human isolates. This may be due to the fact that colistin is used in pig husbandry and for the treatment of gastrointestinal diseases of cattle caused by Enterobacteriaceae (Rhouma et al., 2016). This resistance is frequently related to chromosomal mutations, nonetheless, the mechanism by which the *mcr-1* gene confers resistance to COL was the first one that described plasmid mediated transmission antibiotic resistance and was first discovered in China in a pig farm (Liu et al., 2016). Despite this gene being widespread in the environment (Argudín et al., 2017) and

having been documented in 30 strains isolated from three Spanish WWTPs (Ovejero et al., 2017), only one *E. coli* strain isolated from a rabbit slaughterhouse collector (number 47 in Table 5) was positive for *mcr-1* in our study.

Enterococci are recognized as important nosocomial pathogens due to their natural intrinsic resistance and their ability to acquire resistance to multiple drugs (Argudín et al., 2017). The resistance to VA in enterococci (VRE) is associated with the use of this antibiotic in hospitals and, as a consequence, effluents from hospitals constitute an important point for the transmission of this resistance (Galler et al., 2018). In this respect, despite the fact that VA resistant bacteria were isolated from the hospital collector (37_ARH), none of these isolates was identified as VRE. However, VRE were present in the influent waters of the WWTPs of two points near hospitals (29_ARD1e and 33_ARD3e), in accordance with other studies (Paulshus et al., 2019). In general, VA resistances are specially linked to *vanA* and *vanB* genes and represent a major public health problem, due to their resistant gene transfer capacity (Lozano et al., 2016). In this respect, *vanB* carriers are characterized by high levels of VA resistance and TEC sensitivity, and the resistance is transferred by conjugation associated with the mobilization of genetic material through the acquisition and/or exchange of transposons (Ahmed and Baptiste, 2018). In agreement with that, all our VRE isolates showed the *vanB* phenotype. As VA is not used in veterinary medicine, the use of other glycopeptides as an animal growth promoter (such as avoparcin), was associated with the increase in VRE in the 70s (Ahmed and Baptiste, 2018). Numerous studies have shown that VRE persisted in animals for a long time after avoparcin was banned (Argudín et al., 2017). Therefore, the presence of identical resistance genes in animal and human enterococci, suggest the spread between isolates from different environments (Lozano et al., 2016). The isolation of *E. faecium* VA resistance in

samples from a rabbit slaughterhouse collector (40_ARM) reinforces this hypothesis. Finally, it is known that VRE can rapidly develop resistance after the introduction of new antimicrobial agents in the clinic, such as quinupristin-dalfopristin (SYN), Lz and DAP (Kristich et al., 2014). So, it should be noted that 80% of the *E. faecium vanB* isolates of this study were resistant to SYN and 40% were resistant to DAP, whereas no resistances to Lz were observed.

One of the most important acquired resistances in *S. aureus* is methicillin resistance (MRSA) and is mainly due to the acquisition of the *mecA* gene, encoding a β -lactam low affinity penicillin binding protein (PBP) called PBP2a (Argudín et al., 2017). In general MRSA isolates from surface water are quite rare, with only a low number of isolates being described (Galler et al., 2018). Despite this, MRSA *mecA* has been reported to survive in rivers and municipal wastewater and had been associated with colonized people (Porrero et al., 2014a). In addition, the presence of gene *mecC* has been reported for the first time in a Spanish river, highlighting the potential role of water in the dissemination of *mecC* MRSA (Porrero et al., 2014a). *S. aureus mecC* was also isolated from animals and an urban wastewater treatment plant (Porrero et al., 2014b) and other studies highlighted the emergence of *S. aureus mecC* in livestock production, particularly in pigs in European countries (Boswihi et al., 2020). In this sense, our two MRSA strains (negative for the *mecA* gene in the PBP2a test) were isolated from rivers (numbers 54 and 55 in Table 6) with high incidence from pig exploitations, which would reinforce this hypothesis.

In general, the main objective of wastewater treatment is to eliminate organic (chemical and biological) components, phosphorous and nitrogen nutrients as well as suspended solids. Directive 91/271/EEC (EU, 1991) establishes the guidelines to be followed by the Member States of the European Union to ensure that urban wastewater

receives adequate treatment before discharge, but it does not include disinfection processes that reduce the microbiological charge and ARGs in the effluents (Pallares-Vega et al., 2019). Consequently, these bacteria are incorporated into the environment through the direct or indirect discharge of treated water or through sludge, which finally is used as a fertilizer in agricultural practices. In the same way, the directive does not provide specific restrictions for effluents from hospital wastewater, which also constitute an important reservoir of ARB (Paulshus et al., 2019). It is known that some ARB can be removed through conventional wastewater treatment processes (Jäger et al., 2018), but still large numbers survive in the effluent. Therefore, tertiary treatment methods or advanced treatment technologies are those that manage to eliminate some bacterial load and genes (Makowska et al., 2020). In this sense, UV and ozone-treatment have been investigated for a long time with the aim of reducing these microbial loads. UV disinfection contributes to the effective reduction of some bacteria, like 99.9% of MRSA or VRE (Jäger et al., 2018). However, Munir et al. (2011) founded that this disinfection did not contribute to the reduction of TET and sulfonamide resistant bacteria. Moreover, ozonation is an efficient process to eliminate organic microcontaminants and for inactivating bacteria through the production of highly reactive radicals (Jia et al., 2020). Other tertiary treatments are based on the water exposure to solar radiation in the lagoon and according to López-Martínez, A (2018) are able to reduce the microbiological concentration up to four orders of magnitude at the longest time of exposure to solar radiation. However, these advanced wastewater treatment technologies are also known to accelerate horizontal gene transfer due to the activation of different repair mechanisms involved in the dissemination of antibiotic resistance genes (Jäger et al., 2018). Consequently, it is necessary to develop other additional strategies and guidelines for the elimination of microbial contaminants in

wastewater, including surveillance of pathogenic bacteria and ARGs. For that reason, there is a need to improve effective disinfection measures and treatments in WWTPs and animal slaughterhouses to avoid environmental contamination and prevent the evolution of antibiotic resistance.

The results of this study highlight that bacteria resistant to clinically relevant antibiotics were present in the different water samples examined in the POCTEFA area, with a higher presence in wastewaters from slaughterhouses, hospitals and WWTPs. In order to minimize the dispersion of resistances through the effluents of these areas, it is necessary to implement effective methods of wastewater disinfection and surveillance programs of ARB.

Capítulo 2



Caracterización filogenética de cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de alimentos, aguas y portadores sanos.

Parte de los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *International Journal of Food Microbiology* (Anexo I): Vitas, A.I., Naik, D., Pérez-Etayo, L., and González, D. Increased exposure to extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug-resistant Enterobacteriaceae through the consumption of chicken and sushi products (2018). *Int. J. Food Microbiol.* 269, 80–86.

1. Introducción

Escherichia coli es un microorganismo Gram negativo muy ubicuo, que además de formar parte de la microbiota intestinal de la mayoría de especies animales es uno de los principales agentes etiológicos de distintas infecciones urinarias o gastrointestinales (Allocati et al., 2013).

La gran diversidad de cepas de *E. coli* ha suscitado diversas clasificaciones a lo largo de los años (Johnson and Russo, 2002). Según su capacidad patógena se pueden diferenciar cepas comensales, intestinales y extraintestinales y se ha visto que albergan numerosos factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos (Branger et al., 2005). Herzer et al. (1990) idearon un sistema de clasificación independiente de la capacidad patógena, estableciendo 4 filogrupos: A, B1, B2 y D. Posteriormente, se encontró una relación entre los distintos filogrupos y la capacidad patógena de las cepas. Así, los filogrupos A y B1 albergan cepas comensales con bajo poder virulento, mientras que los filogrupos B2 y D incluyen fundamentalmente cepas patógenas extraintestinales que expresan factores de virulencia responsables de promover las etapas de colonización, adherencia, invasión, etc (Johnson et al., 2001; Gonçalves et al., 2010; Millán et al., 2014). Más adelante, Clermont et al. (2000) desarrollaron una técnica molecular para la detección de estos cuatro grupos filogenéticos, que fue mejorada años después modificando los cebadores y las condiciones de la PCR (Clermont et al., 2013). Así, la nueva clasificación filogenética alberga siete filogrupos (A, B1, B2, C, D, E y F) que pertenecen a la especie *E. coli sensu stricto* y un octavo que pertenece al clado de *Escherichia*. Este clado se divide en cinco grupos (Clados I-V), muy parecidos fenotípica y bioquímicamente a *E. coli*, pero genéticamente distantes (Clermont et al., 2011).

Dado el interés por los estudios filogenéticos de estas cepas, Wirth et al. (2006) desarrollaron una base de datos para el estudio de *E. coli* mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Así, cada cepa de *E. coli* se asocia con una secuencia tipo (ST) y complejo clonal (CC). Diversos estudios han investigado la estructura poblacional de los distintos aislamientos de *E. coli* productoras de BLEE y se ha podido observar la gran diversidad de STs existentes. Además, se han encontrado múltiples asociaciones entre distintos complejos clonales y filogrupos, como es el caso de la ST131 y el filogrupo B2 (Mathers et al., 2015; Merino et al., 2016).

Por tanto, resulta interesante determinar las relaciones génicas de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido presentes en distintos entornos. Así, el objetivo principal de este capítulo ha sido caracterizar la diversidad clonal de una colección de cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en Navarra (entorno animal, ambiental y humano), procedentes de diversos estudios realizados por nuestro grupo de investigación. En concreto, se han seleccionado cepas aisladas de carnes de pollo y pavo, como representantes del entorno animal, dada la alta prevalencia de bacterias productoras de BLEE encontrada en este grupo de alimentos (Ojer-Usoz et al., 2013; Vitas et al., 2018); cepas aisladas de entornos acuáticos (ríos, colectores y estaciones depuradoras de aguas residuales [EDAR]) (Ojer-Usoz et al., 2014; Pérez-Etayo et al., 2020) y, por último, cepas de origen humano procedentes de portadores sanos (González et al., 2019).

2. Material y Métodos

2.1. Selección de cepas de *E. coli*

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron 59 cepas de *E. coli* aisladas de alimentos procesados de pavo y pollo ($n=21$), aguas ($n=25$) y portadores sanos ($n=13$). La caracterización fenotípica y genotípica confirmó que eran productoras de BLEE, aunque en dos de ellas no se detectaron genes de β -lactamasas (Vitas et al., 2018; González et al., 2019; Pérez-Etayo et al., 2020). Además, se incluyeron en el estudio 2 cepas resistentes a colistina aisladas de aguas (dada la relevancia de la resistencia a este antibiótico usado en última instancia en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes), detectándose el gen *mcr-1* en una de ellas (Pérez-Etayo et al., 2020). Las principales características de las 61 cepas en relación con el tipo de aislamiento, genes de resistencia y el perfil de resistencia a distintos antibióticos, se muestran en la Tabla 2.1. Cabe destacar que el 96,7% de las cepas tenía un perfil de multirresistencia a antibióticos (MDR) y el 73,8% de MDR extendida (resistencias al menos a tres o cinco familias de antibióticos, respectivamente).

Tabla 2.1. Principales características de las cepas seleccionadas para este estudio

Nº cepa	Origen	Gen resistencia	Perfil de resistencia a antibióticos ²										MDR	MDR Extendida
			Penicilinas	Cefalosporinas	Monobactams	Inhibidores- lactamasas	Carbapenems	Aminoglicósidos	Quinolonas	Tetracilinas	Otros			
1	Pollo (F)	SHV-12	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	CHL	+	+
2	Pollo (H)	CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	-	TET	SXT	+	+
3	Pollo (H)	SHV-12, TEM-171	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	CHL	+	+
4	Pollo (H)	CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	ETP, MER, IMP	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT	+	+
5	Pollo (N)	SHV-12	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	-	TET	CHL	+	+
6	Pollo (H)	SHV-12, TEML-278	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, CHL	+	+
7	Pollo (H)	CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	-	-	-	+	-
8	Pollo (H)	SHV-12, TEM-171	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	GM, TO	-	TET	CHL	+	+
9	Pollo (H)	SHV-12	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	-	+	+
10	Pavo (A)	SHV-12	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	MXF	TET	CHL	+	+
11	Pavo (A)	SHV-12	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	CHL	+	+
12	Pollo (N)	SHV-12	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	MXF	TET	CHL	+	+
13	Pollo (L)	SHV-12, TEM-171	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, CHL	+	+
14	Pollo (L)	SHV-12, CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	CHL	+	+
15	Pollo (F)	SHV-12, TEM-171	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	-	-	-	+	-
16	Pollo (F)	SHV-12, TEM-171, CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC	-	-	GM, TO	-	-	-	+	+
17	Pollo (F)	SHV-12	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	-	TET	-	+	-
18	Pollo (F)	CTX-M14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT	+	+
19	Pollo (N)	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	CHL	+	+
20	Pollo (F)	SHV-12, TEM-171, CTX-M-14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	-	+	-
21	Pavo (F)	TEML-278	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMS	-	-	-	CIP, MXF	TET, TIG	SXT	+	+
22	Agua (R)	TEML-278, CTX-M-14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMS	-	-	GM, TO	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT, CHL	+	+
23	Agua (R)	TEML-278, CTX-M-14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS	-	-	GM, TO	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT, CHL	+	+
24	Agua (R)	TEML-278, CTX-M-14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS	-	-	GM, TO	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT, CHL	+	+
25	Agua (R)	CTX-M-15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS	MER	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET, TIG	SXT, CHL	+	+
26	Agua (R)	TEML-278, CTX-M-14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	-	+	+
27	Agua (R)	CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	-	TET	CHL	+	+
28	Agua (R)	CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	-	TET	CHL	+	+
29	Agua (R)	TEML-278, SHV-12	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	-	-	TET	-	+	-
30	Agua (R)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	COL	-	-
31	Agua (E)	CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	-	TET	-	+	+
32	Agua (E)	TEML-278, CTX-M-14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	-	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	-	+	-
33	Agua (E)	CTX-M-14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMS	-	-	-	-	-	SXT, FOT	+	+

Tabla 2.1. Cont.

Nº cepa	Origen ¹	Gen resistencia	Perfil de resistencia a antibióticos ²										
			Penicilinas	Cefalosporinas	Monobactams	Inhibidoresβ-lactamasas	Carbapenems	Aminoglicósidos	Quinolonas	Tetracilinas	Otros	MDR MDR Extendida	
34	Agua (E)	CTX-M-15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	-	-	-	SXT	+ -
35	Agua (E)	SHV-12, CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	-	CHL	+ +
36	Agua (E)	TEML-278, SHV-12, CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	-	SXT, CHL	+ +
37	Agua (E)	TEM-171, CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	-	-	-	+ -
38	Agua (E)	TEML-278, CTX-M-14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	-	AMS	-	-	GM, TO	-	TET	SXT	+ +
39	Agua (E)	TEML-278, CTX-M-14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	-	AMS	-	-	GM, TO	-	TET	SXT	+ +
40	Agua (E)	TEML-278, CTX-M-1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	GM, TO	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, FOT	+ +
41	Agua (E)	TEM-171, CTX-M-15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	-	-	TET	-	+ -
42	Agua (E)	TEML-278, CTX-M-15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS	-	-	-	-	-	FOT	+ +
43	Agua (E)	TEM-176, CTX-M-14, CTX-M-15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	-	-	-	-	-	-	-	-	- -
44	Agua (E)	OXA-1, CTX-M-15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS	-	-	TO	LV, CIP, MXF, NOR	-	SXT	+ +
45	Agua (E)	TEML-278	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	ETP, MER, IMP	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	SXT, FOT	+ +
46	Agua (C)	CTX-M-15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	SXT, CHL	+ +
47	Agua (C)	CTX-M-15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	-	-	-	-	-	COL, FOT	+ +
48	Agua (C)	<i>mcr-1</i>	-	-	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	-	COL, SXT	+ -
49	Portador sano	TEM-116, CTX-M14	AMP	CZ, CXM, FEP	-	-	-	-	-	-	TET	COL	+ -
50	Portador sano	TEM-116, CTX-M14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	GM, TO	-	TET	STX	+ +
51	Portador sano	TEML-171, CTX-M1	AMP, MZ	CZ, CXM, CPD, CAZ, FOX	-	AMC, AMS	-	-	-	-	-	-	+ -
52	Portador sano	TEML-171, CTX-M1	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	-	-	STX	+ +
53	Portador sano	TEM-171, CTX-M14, CTX-M15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	-	-	STX	+ +
54	Portador sano	CTX-M14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	-	-	TET	STX	+ +
55	Portador sano	TEM-171	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	TET	STX	+ +
56	Portador sano	TEM-171, CTX-M15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	COL	+ +
57	Portador sano	TEM-171, CTX-M15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	FOT	+ +
58	Portador sano	CTX-M14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	-	+ -
59	Portador sano	CTX-M14	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	-	+ -
60	Portador sano	CTX-M15	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	STX	+ +
61	Portador sano	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT -	-	-	-	-	LV, CIP, MXF, NOR	-	STX	+ +

¹ F, filete; H, hamburguesa; N, nugget; A, albóndigas; L, longaniza; R, río; E, EDAR; C, colector. ²AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; MZ, mezlocilina; CZ, cefazolina; CXM, cefuroxima; CPD, cefpodoxima; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FOX, cefoxitina; FEP, cefepime; AZT, aztreonam; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; AMS, ampicilina-sulbactam; TZP, piperacilina-tazobactam; ETP, ertapenem; MER, meropenem; IMP, imipenem; GM, gentamicin; TO, tobramicina; LV, levofloxacin; CIP, ciprofloxacino; MXF, moxifloxacino; NOR, norfloxacino, TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; FOT, fosfomicina; CHL, cloranfenicol, COL, colistina.

2.2. Extracción del ADN bacteriano

A partir de un cultivo fresco se inoculó una colonia en 5 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI, Scharlab) y se incubó a 37°C durante 18-24 h. A partir del caldo crecido se tomaron 2 ml para su centrifugación a 5000 X g. durante 10 min (Fisher Micro Centrifuge Model 235A). Seguidamente se extrajo el ADN total empleando el kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Barcelona, España), con un protocolo modificado de pre-tratamiento para bacterias Gram negativas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, se comprobó la calidad y concentración (ng/μl) del ADN extraído mediante el espectrofotómetro NANO DROP 100 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Estados Unidos). Los extractos se conservaron a -20°C hasta su utilización.

2.3. Determinación de grupos filogenéticos

La determinación de los grupos filogenéticos se realizó mediante la técnica de PCR descrita por Clermont et al. (2013), que consiste en una PCR cuádruplex y dos PCRs simples. Esta reacción se basa en la amplificación de tres genes (*chuA*, *yjaA* y *arpA*) y un fragmento de ADN (TspE4.C2) que permite clasificar cada una de las cepas en uno de los ocho grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E, F y *Escherichia clado I*).

Las distintas reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μl. El primer paso fue realizar la PCR cuádruplex, empleando las siguientes cantidades: 2 μl de ADN, 2,5 μl de buffer 10X (Bioline), 2,5 μl de dNTPs (Bioline), 1 μl de MgCl₂ 50 mM (Bioline), 2 μl de los cebadores *chuA.1b*, *chuA.2*, *yjaA.1b*, *yjaA.2b*, *TspE4.C2.1b*, *TspE4.C2.2b*, *AceK.f* y *ArpA1.R* (Sigma Aldrich), 1,5 U de Inmolase™ DNA polymerase (Bioline) y agua tipo II (Millipore) hasta completar el volumen final. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes: 4 min a 95°C,

seguido de 30 ciclos de 35 s a 95°C, 45 s a 59°C, 2 min a 72°C y un ciclo final de 5 min a 72°C.

A partir del genotipo cuádruple obtenido, o bien se asignó directamente cada cepa a un filogrupo, o se realizaron otras dos PCRs simples adicionales. En estas dos PCRs simples se utilizaron las mismas condiciones descritas anteriormente, pero añadiendo los cebadores específicos E y C y sus temperaturas de hibridación correspondientes: 57°C (grupo E) y 59°C (grupo C). Todas las secuencias nucleotídicas de los cebadores empleados se detallan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Secuencias de los cebadores empleados para la PCR cuádruplex y PCRs simples (Clermont et al., 2013)

PCR	Cebador*	Gen	Secuencias del cebador (5´-3´)	Tamaño amplicón (pb)
Cuádruplex	chuA.1b	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
	chuA.2		TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
	yjaA.1b	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTTCAGGAG	211
	yjaA.2b		AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
	TspE4C2.1b	TspE4.C2	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
	TspE4C2.2b		AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	
Grupo E	AceK.Fw	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
	ArpA1.Rv		TCTCCCCATACCGTACGCTA	
Grupo E	ArpAgpE.Fw	<i>arpA</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301
	ArpAgpE.Rv		GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	
Grupo C	trpAgpC.1	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219
	trpAgpC.2		TCTGCGCCGGTCACGCCC	
Control interno	trpBA.Fw	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489
	trpBA.Rv		GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	

*Fw: Forward; Rv: Reverse.

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica se basa en la migración unidireccional del ADN a través de una matriz porosa cuando se aplica un campo eléctrico. La migración es proporcional al logaritmo del peso molecular, lo que permite discriminar las bandas según el tamaño de los fragmentos. Los tamaños de los amplicones se calcularon en comparación con el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen, Barcelona, España). Se preparó un gel de agarosa al 1% mezclando 1 g de agarosa (Pronadisa, Alcobendas,

Madrid, España) y 100 ml de una solución de TBE 1X (Sigma Aldrich). Se utilizó un sistema de voltaje constante a 120 V (Bio-Rad, Hércules, CA, EEUU) durante 45 min y posteriormente se tiñó el gel durante 10 min en una solución de bromuro de etidio (Bio-Rad). Finalmente, se visualizó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (Universal Hood II, BioRad). La Figura 2.1. ilustra el aspecto de los geles de electroforesis de la PCR cuádruplex.

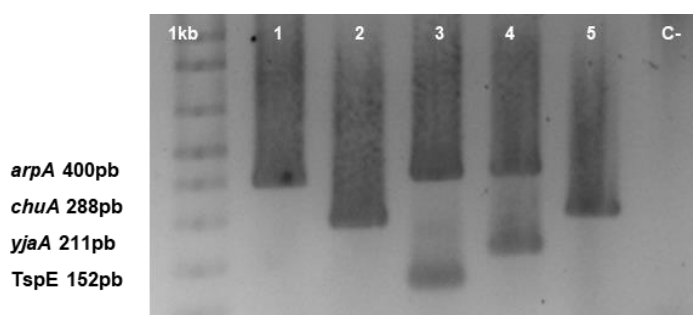


Figura 2.1. Ejemplo de un gel de electroforesis de una PCR cuádruplex. Calles 1-5: cepas de *E. coli* n° 1 al n° 5 aisladas de alimentos (Tabla 2.1)

Para clasificar las cepas en los filogrupos descritos anteriormente, se siguió el árbol de decisión dicotómico propuesto por Clermont et al. (2013), basado en la presencia o ausencia de estos fragmentos de ADN (Figura 2.2).

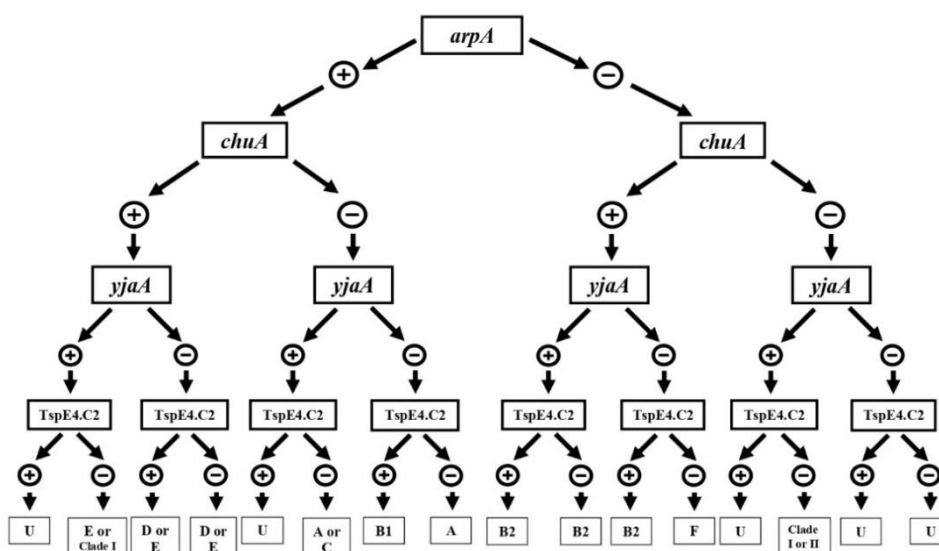


Figura 2.2. Esquema de flujo que permite la determinación del grupo filogenético de una cepa de *E. coli* basada en los resultados de la amplificación por PCR de los distintos genes (Clermont et al., 2013).

2.4. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Se llevó a cabo la técnica de MLST desarrollada por Wirth et al. (2006), que permitió asignar a cada cepa su correspondiente secuencia tipo (ST) y complejo clonal (CC). Para ello, se realizaron distintas PCRs utilizando siete genes conservados de *E. coli*, seleccionados de la base de datos de MLST de la Universidad de Warwick. Estos genes codifican para las siguientes proteínas: *adk*, adenilato ciclasa; *fumC*, fumarato hidratasa; *gyrB*, ADN girasa; *icd*, isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa; *mdh*, malato deshidrogenasa; *purA*, adenilosuccinato y *recA*, motivo unión a ATP/GTP.

La reacción de PCR para el análisis del MLST se realizó según el procedimiento descrito por Tartof et al. (2005) en un volumen total de 50 µl: 3 µl del ADN extraído anteriormente, 5 µl de buffer 10X (Bioline), 5 µl de dNTPs (Bioline), 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Bioline), 2 µl de cada cebador (Sigma-Aldrich), 1,5 U de Inmolase™ (Bioline) y agua tipo II (Millipore) hasta completar el volumen final (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Secuencias de los cebadores y condiciones de ensayo para el tipado de *E. coli* por MLST (Tartof et al., 2005)

Gen	Cebador*	Secuencias del cebador (5'-3')	T hibridación (°C)	Tamaño amplificación (pb)
<i>adk</i>	Adk-Fw	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	54	583
	Adk-Rv	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>fumC</i>	FumC-Fw	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	54	806
	FumC-Rv	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>icd</i>	Icd-Fw	ATGGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	54	878
	Icd-Rv	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>purA</i>	purA-Fw	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	54	816
	purA-Rv	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>gyrB</i>	gyrB-Fw	TCGGCGACACGGATGACGGC	60	880
	gyrB-Rv	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>recA</i>	recA-Fw	CGCATTCGCTTTACCCGTGACC	60	734
	recA-Rv	TCGTGCGAAATCTACGGACCGGA		
<i>mdh</i>	mdh-Fw	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG	60	932
	mdh-Rv	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT		

*Fw: Forward; Rv: Reverse

Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes: 3 min a 94°C; seguido de 30 ciclos de 1 min 59°C, 1 min a la temperatura de unión de cada

cebador, 2 min a 72°C, y un ciclo final de 5 min a 72°C. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (ver apartado 2.3).

Posteriormente, los amplicones se secuenciaron en el servicio EZ-Seq de MacroGen Europe (Ámsterdam, Países Bajos). Las secuencias obtenidas en formato FASTA se editaron con distintas herramientas bioinformáticas (Sequence Massager, Reverse complement, etc.) y se compararon con la base de datos MLST Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) utilizando la herramienta ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). De este modo, se introdujo la secuencia obtenida del gen bajo estudio, pudiendo así determinar a qué secuencia alélica correspondía. Se repitió este proceso para obtener los alelos correspondientes a los siete genes estudiados y finalmente se asignó cada resultado con la secuencia tipo (ST) y complejo clonal (CC) correspondiente. Por último, una vez analizadas todas las cepas de *E. coli*, se introdujeron los datos de cada alelo, las ST y los CC en el programa BioNumerics version 7.6 (Applied Maths NV/bioMérieux, Sint-Martens-Latem, Belgium). De este modo se crearon árboles filogenéticos o MST (*Minimum Spanning Tree*) que se basan en el número de alelos comunes de cada cepa. Este algoritmo matemático permite reconstruir a partir de los datos del MLST las relaciones filogenéticas existentes entre las distintas cepas aisladas y los diferentes grupos clonales.

2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron con el software SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU) aplicando la prueba de Chi-cuadrado (X^2) con un nivel de significación de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Clasificación de las cepas de *E. coli* BLEE según grupos filogenéticos.

Las 61 cepas de *E. coli* analizadas se clasificaron en los distintos grupos filogenéticos mencionados anteriormente, tal y como se muestra en la Figura 2.3. Se observa que el filogrupo A es el que agrupa el mayor número de cepas (29,5%), seguido del B1 y B2. Los grupos filogenéticos C, E y Clado I o II fueron los menos prevalentes. Por otro lado, en un 8,2% de las cepas ($n=5$) no se pudo llevar a cabo la clasificación filogenética, por lo que fue necesario realizar la técnica MLST como veremos posteriormente.

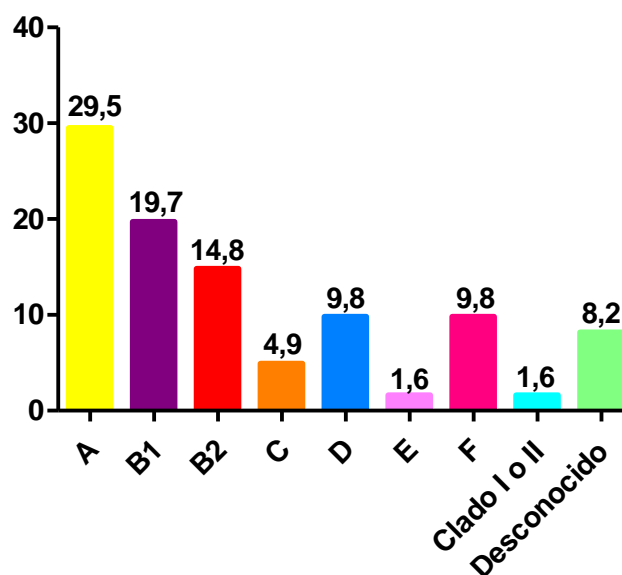


Figura 2.3. Porcentajes de cepas de *E. coli* por grupos filogenéticos.

La distribución de filogrupos teniendo en cuenta la procedencia de cada cepa se muestra en la Figura 2.4. Se observa que las cepas procedentes de alimentos y aguas pertenecen principalmente al filogrupo A, mientras que las cepas humanas (portadores sanos) se asocian en su mayoría al filogrupo B2.

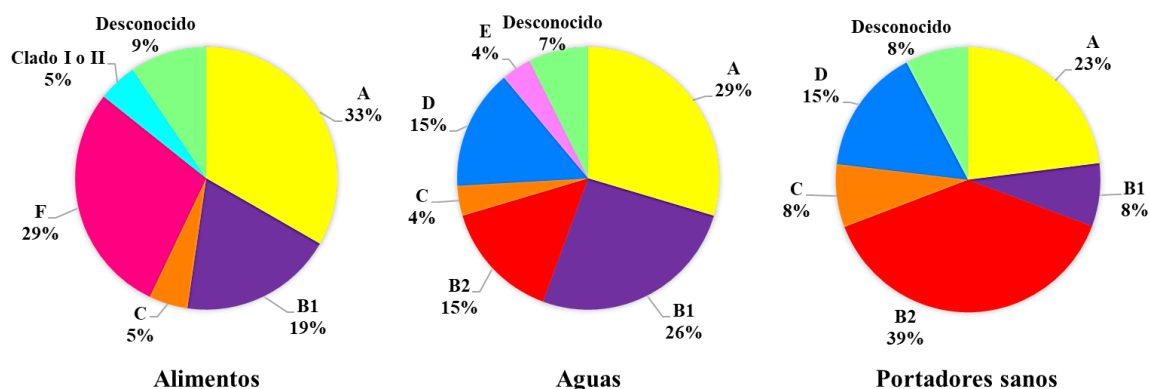


Figura 2.4. Distribución de las cepas de *E. coli* en grupos filogenéticos según su origen.

Los filogrupos B2 y D (que incluyen fundamentalmente cepas patógenas extraintestinales) se identificaron únicamente entre las cepas aisladas de aguas y de portadores sanos, con una mayor prevalencia del grupo B2 en el entorno humano. Por el contrario, los filogrupos A, B1 y C (que albergan principalmente cepas comensales con bajo poder virulento) se detectaron en los tres entornos estudiados, no encontrándose diferencias significativas en las prevalencias observadas ($p > 0.05$) (en el caso del filogrupo B1 probablemente debidas al pequeño tamaño muestral de portadores sanos). Por otro lado, cabe destacar que los filogrupos F y Clado I o II solamente estuvieron presentes en cepas de alimentos y la detección del nuevo filogrupo E en una única cepa aislada de agua.

Al mismo tiempo, se estudió la relación de los principales genes *bla* presentes en estas cepas (Tabla 2.1) con los grupos filogenéticos (Figura 2.5). En general, no se encontró una asociación de genes *bla* con un determinado grupo filogenético, aunque se observa que las cepas de *E. coli* productoras de *bla*_{CTX-M15} pertenecían en su mayoría al filogrupo B2 (42%), a diferencia de *bla*_{CTX-M1}, que se asoció principalmente al filogrupo comensal A. Los filogrupos A, B1, F y D se encontraron asociados con todos los tipos de BLEE (excepto CTX-M15 en el caso de los filogrupos F y D; y SHV-12 en el filogrupo D). Por otro lado, el grupo filogenético B2 se asoció con los genes *bla*_{CTX-M14}, *bla*_{CTX-M15} y *bla*_{TEM-171}, mientras que el grupo C solamente fue encontrado en asociación

con genes *bla* del tipo CTX-M (excepto *bla*_{CTX-M14}). Finalmente, cabe destacar que el Clado I o II solo se detectó en cepas portadoras de *bla*_{SHV-12} y el filogrupo E fue asociado únicamente con una cepa portadora de dos tipos de β-lactamasas, *bla*_{CTX-M14} y

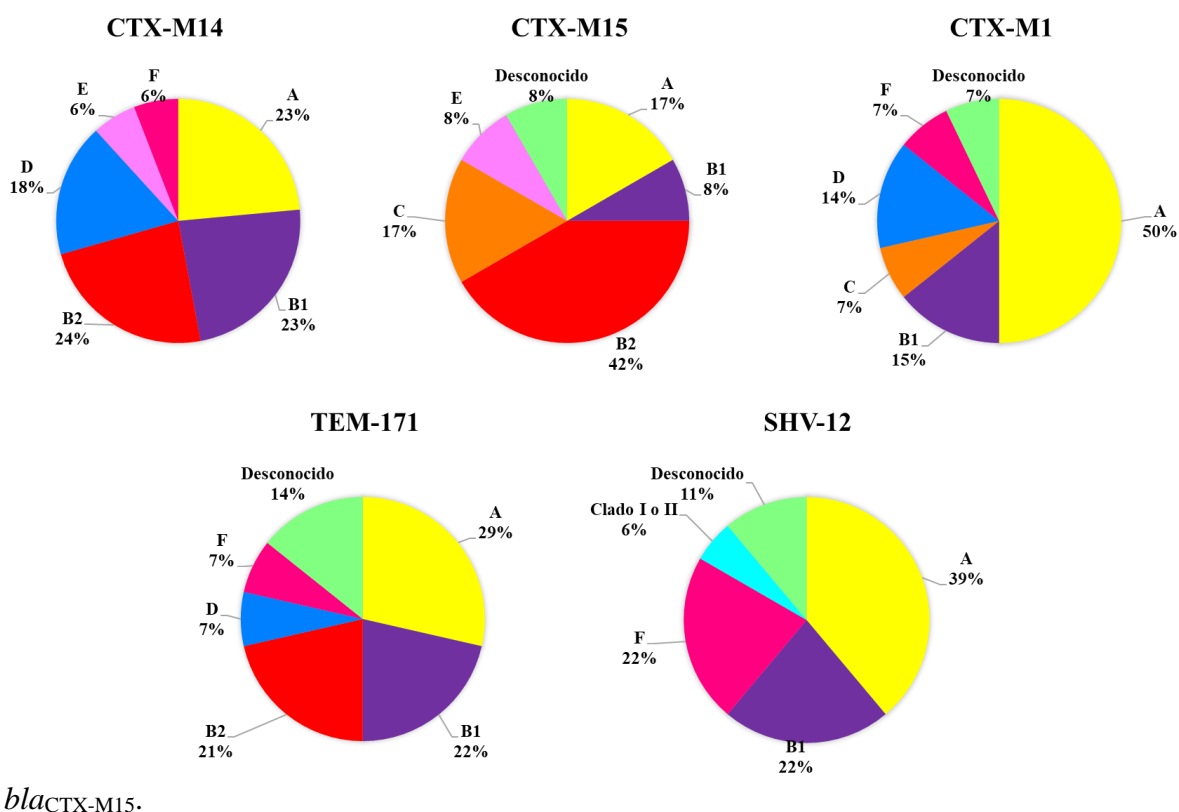


Figura 2.5. Distribución de cepas de *E. coli* productoras de distintos tipos de BLEE en los grupos filogenéticos

3.2. Análisis de complejos clonales y secuencias tipo mediante MLST

El análisis de los datos obtenidos por MLST mediante el programa BioNumerics, permitió establecer las relaciones taxonómicas y filogenéticas mediante la creación de distintos árboles filogenéticos con la herramienta MST (*Minimum spanning tree*). Las Figuras 2.6 a 2.13 muestran el número de alelos discordantes entre los perfiles de las cepas representados mediante las líneas de unión entre los nodos (líneas negras, continuas, con guiones o punteadas en función de la presencia de 1, 2, 3 y 4 alelos discordantes, respectivamente).

3.2.1. ST y CC en cepas procedentes de alimentos

El análisis MLST de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de pavo y pollo mostró una gran diversidad de ST, con un total de 15 diferentes en 21 cepas (Figura 2.6). La ST prevalente fue ST117 (14,3%), seguida de ST23 (9,5%) y ST354 (9,5%). Además, dos de las cepas no se asociaron con ninguna secuencia tipo conocida.

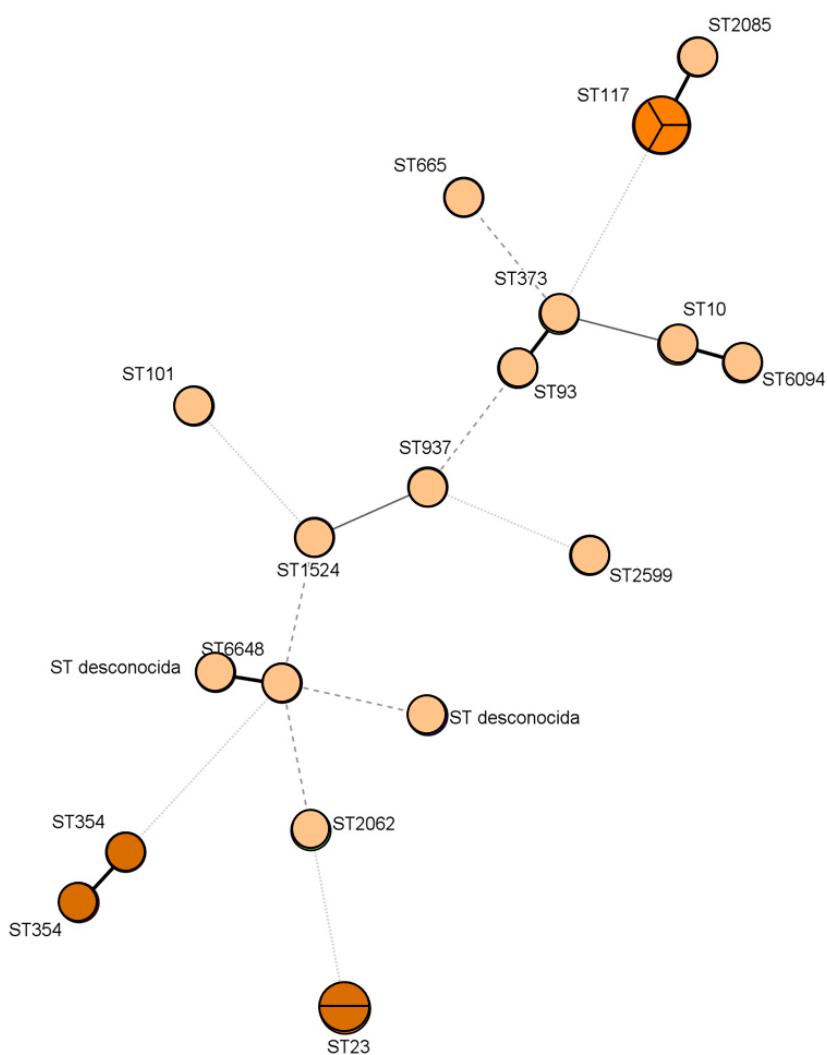


Figura 2.6. Composición clonal por MST de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de alimentos. Cada círculo corresponde con una ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. Las líneas de unión entre los distintos nodos (líneas negritas, continuas, con guiones o punteadas) muestran el nº de alelos discordantes entre los perfiles de las cepas (1, 2, 3 y 4 alelos, respectivamente).

En términos de complejo clonal (CC), se detectaron 5 CC diferentes y los predominantes fueron 23CC, 354CC y 168CC (9,5%), ya que, hasta la fecha, la secuencia tipo ST117 no está asociada con ningún complejo conocido (Figura 2.7). Los otros dos complejos clonales detectados fueron el 10CC y 101CC, este último asociado con el filogrupa comensal B1. A pesar de las distancias encontradas en el árbol filogenético, las 3 cepas pertenecientes a la ST117, una cepa ST2085 y las dos cepas ST354 se identificaron como pertenecientes al nuevo filogrupa F. En cuanto a las cepas que se agruparon en los complejos clonales 168CC y 10CC todas ellas se asociaron al filogrupa A, mientras que las dos pertenecientes al complejo clonal 23CC, eran de distintos filogrupos (C y Clado I o II).

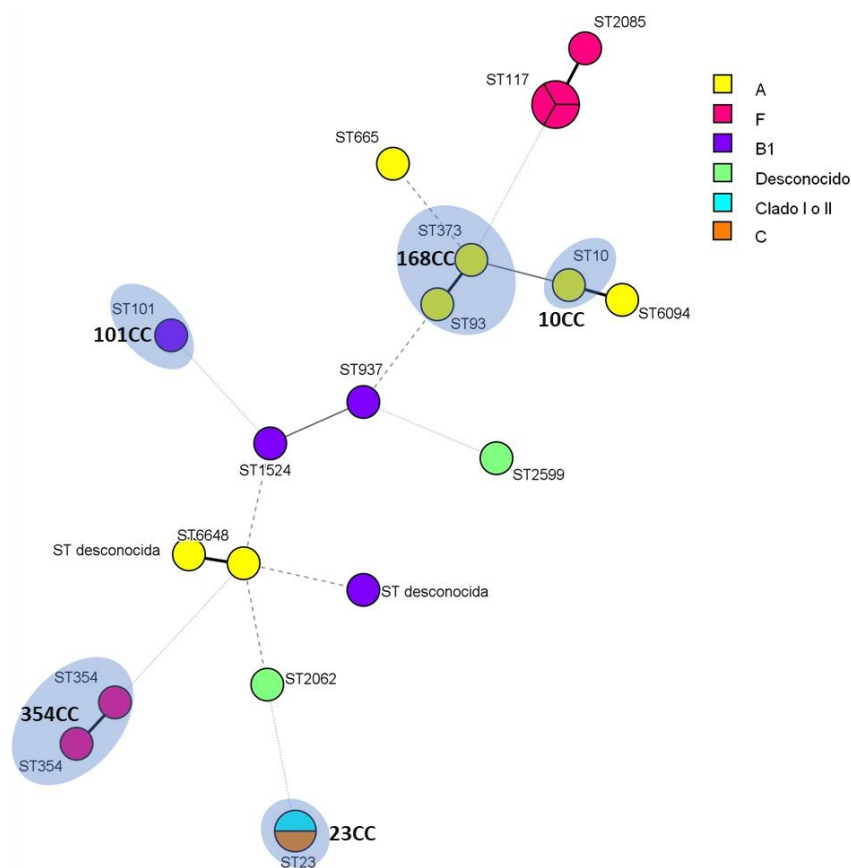


Figura 2.7. Composición clonal por MST de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de alimentos en relación con el filogrupa al que corresponde cada aislado, tal como indican los colores de la leyenda. Las áreas sombreadas indican los CC detectados que agrupan distintas ST. Las líneas de unión entre los distintos nodos (líneas negras, continuas, con guiones o punteadas) muestran el n° de alelos discordantes entre los perfiles de las cepas (1, 2, 3 y 4 alelos, respectivamente).

3.2.2. ST y CC en cepas procedentes de aguas.

El estudio filogenético por MLST de las 27 cepas aisladas de entornos acuáticos, mostró la presencia de 20 secuencias tipo diferentes, siendo las más frecuentes ST131, ST1434, ST1486 y ST38, todas ellas con una prevalencia del 7,4% (Figura 2.8). Por otro lado, tres de las cepas no se asociaron con ninguna secuencia tipo conocida.

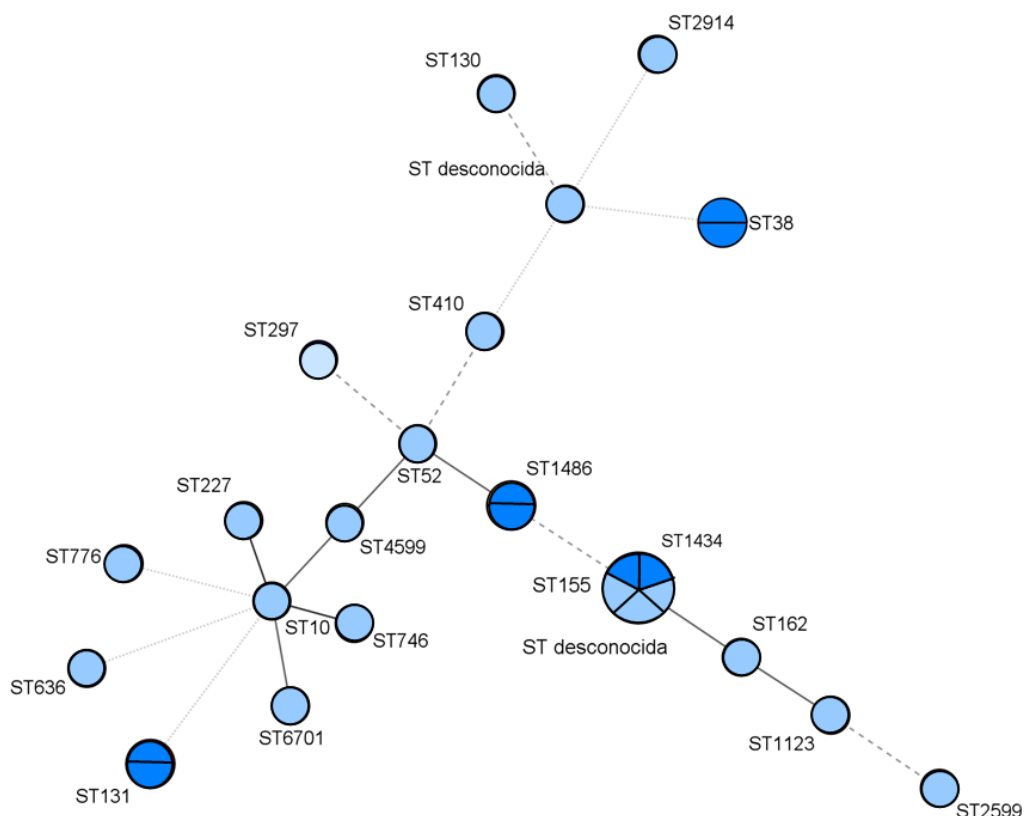


Figura 2.8. Composición clonal por MST de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de aguas. Cada círculo corresponde con una ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. Las líneas de unión entre los distintos nodos (líneas negritas, continuas, con guiones o punteadas) muestran el nº de alelos discordantes entre los perfiles de las cepas (1, 2, 3 y 4 alelos, respectivamente).

Se detectaron 8 complejos clonales diferentes, con una prevalencia idéntica entre 10CC, 131CC y 38CC (7,4%). En cuanto al origen de las cepas, hay que destacar que a excepción del 155CC y 23CC que han sido detectados en colector de un matadero y de un río, respectivamente, el resto de los complejos clonales han sido detectados en aguas procedentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Tal como está descrito en la bibliografía (Mathers et al., 2015; Merino et al., 2016), las dos cepas

asociadas al complejo clonal 131CC se encuadraron dentro del filogrupa patógeno B2, mientras que las cepas del complejo 38CC se asociaron con el filogrupa D (Figura 2.9). Por otro lado, la cepa perteneciente al complejo 155CC y portadora del gen de resistencia a colistina *mcr-1* también se asignó al filogrupa B2, a pesar de encontrarse filogenéticamente distante del 131CC. Los filogrupos A y B1 se asociaron con una mayor diversidad de ST, repartidas por todo el árbol filogenético y el complejo 10CC se relacionó con el filogrupa A, al igual que una de las cepas anteriores aisladas de muestras de pollo. Lo mismo ocurrió con el complejo 23CC, que se detectó únicamente en una cepa y en este caso perteneciente al filogrupa C. Finalmente, el nuevo filogrupa E detectado en una única cepa, parece estar relacionado con el complejo clonal 31CC (ST130).

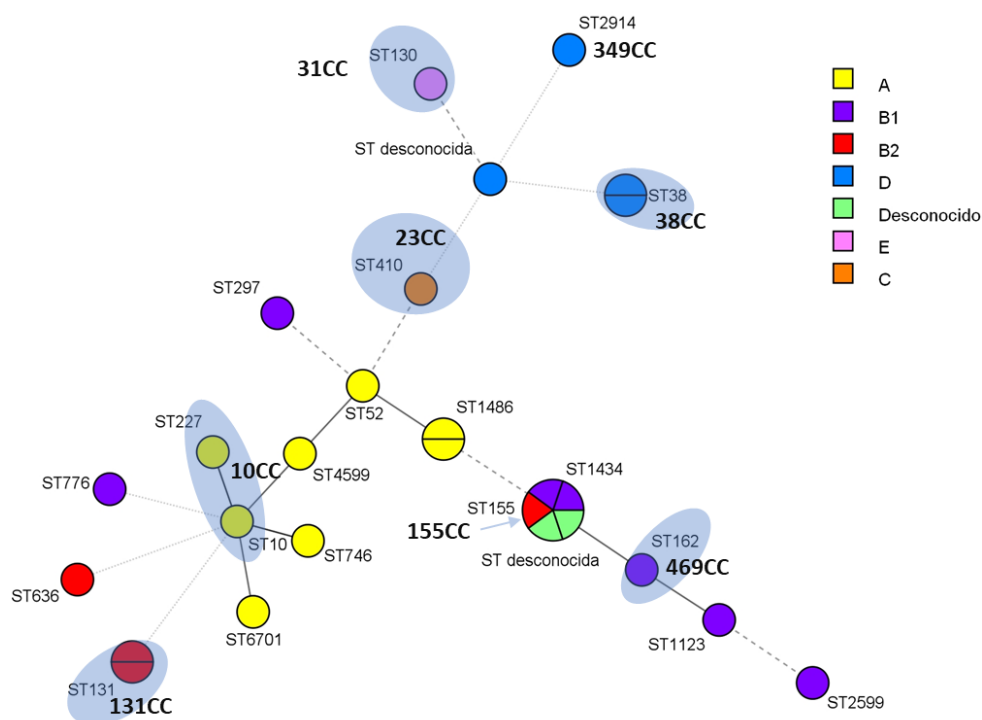


Figura 2.9. Composición clonal por MST de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de aguas. Cada círculo corresponde con una ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el filogrupa al que corresponde cada aislado, tal como se indica en la leyenda. Las áreas sombreadas indican los CC detectados que agrupan distintas ST. Las líneas de unión entre los distintos nodos (líneas negras, continuas, con guiones o punteadas) muestran el nº de alelos discordantes entre los perfiles de las cepas (1, 2, 3 y 4 alelos, respectivamente).

3.2.3. ST y CC en cepas procedentes de portadores sanos.

La composición clonal de las 13 cepas de *E. coli* productoras de BLEEs aisladas de portadores sanos, se muestra en la Figura 2.10. Se han detectado 5 ST diferentes, siendo la ST131 la más prevalente (30,8%). El resto de ST están representadas en 4 cepas diferentes (ST971, ST2404, ST38 y ST3483), mientras que las 5 cepas restantes no se vieron relacionadas con ninguna secuencia tipo conocida.

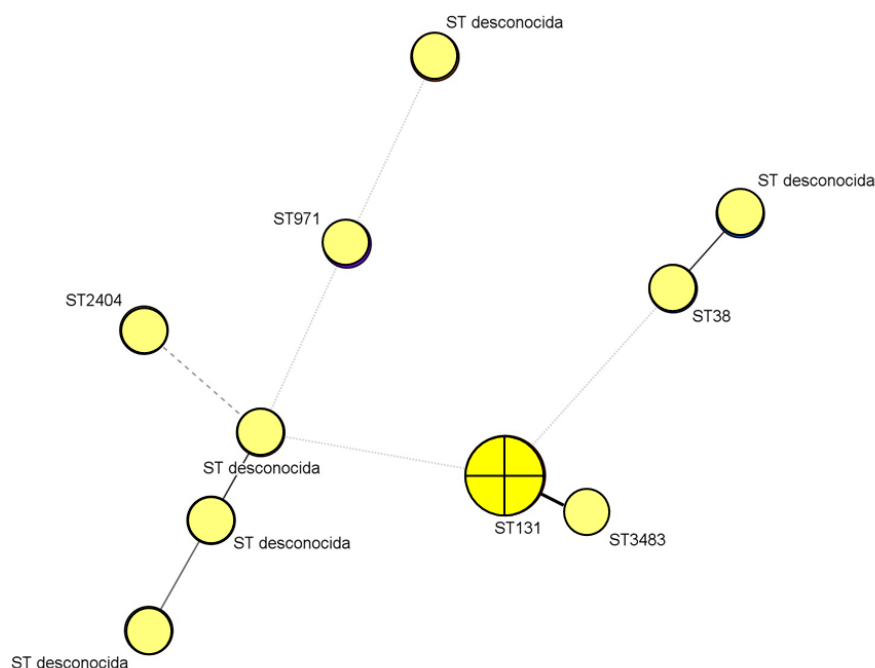


Figura 2.10. Composición clonal por MST de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de portadores sanos. Cada círculo corresponde con una ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. Las líneas de unión entre los distintos nodos (líneas negritas, continuas, con guiones o punteadas) muestran el nº de alelos discordantes (1, 2, 3 y 4 alelos respectivamente) entre los perfiles de las cepas.

A su vez se establecieron 2 complejos clonales diferentes: las 4 cepas correspondientes a ST131 y la cepa ST3483 (todas ellas pertenecientes al filogrupo B2) se definieron como 131CC, mientras que el complejo clonal 38CC incluyó solamente a la cepa ST38, asociada con el filogrupo D (Figura 2.11). Como se puede observar en el MST, ambos complejos se encuentran próximos y han sido relacionados con cepas más patógenas.

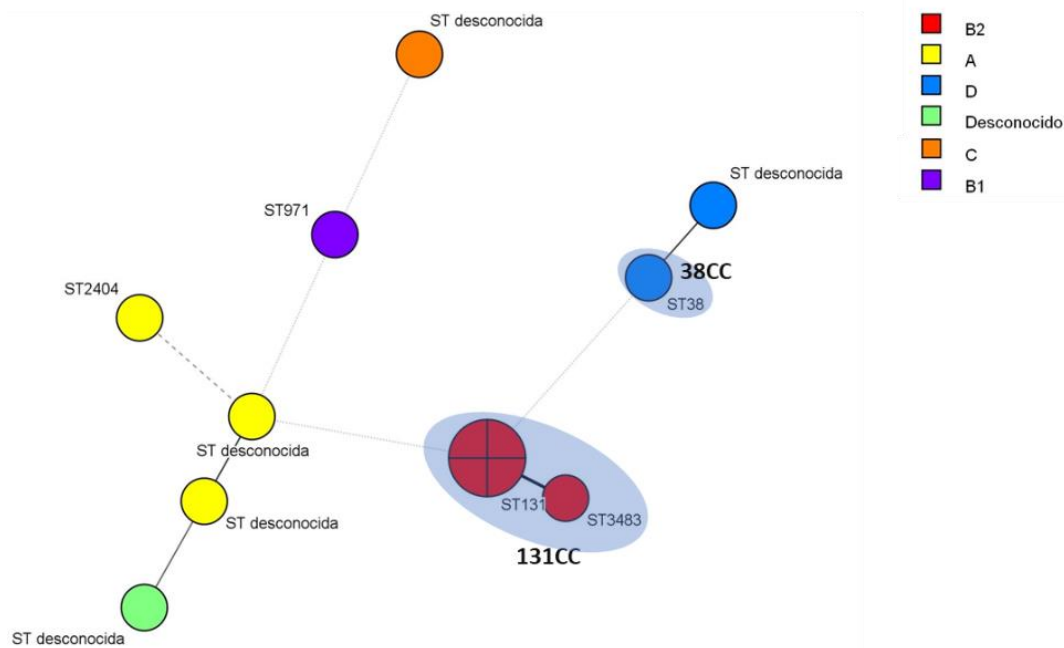


Figura 2.11. Composición clonal por MST de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de portadores sanos. El color de los círculos indica el filogrupo al que corresponde cada aislado, tal como se indica en la leyenda. Las áreas sombreadas indican los CC detectados que agrupan distintas ST. Las líneas de unión entre los distintos nodos (líneas negras, continuas, con guiones o punteadas) muestran el n° de alelos discordantes (1, 2, 3 y 4 alelos respectivamente) entre los perfiles de las cepas.

3.2.4. Relación de ST y CC de cepas aisladas de distintos entornos

En la Figura 2.12 se identifican las 36 STs y 11 CCs determinados en este estudio en relación con el tipo de ambiente en el que fueron aisladas cada una de las cepas. A pesar de que algunas STs se agrupan de manera homogénea según nichos de aislamientos, las que están señaladas con flechas aparecen en distintos entornos (ST10, ST131, ST2599 y ST38). Cabe resaltar que la misma ST o CC no ha sido compartida por cepas procedentes de los tres entornos y tampoco se ha dado la coincidencia entre cepas aisladas de alimentos y portadores sanos.

La ST131 (asociada con el filogrupo B2) ha sido la más prevalente (presente en 4 cepas de portadores sanos y 2 cepas de entornos acuáticos), seguida de la ST117 (asociada con el filogrupo F) que en este caso solamente se ha encontrado en entorno animal y ST38 (asociada con el filogrupo D) diseminada entre entornos acuáticos y de

origen humano. Por su parte, el 131CC ha sido el que ha agrupado mayor nº de cepas (11,5%), seguido de 10CC, 38CC y 23CC, con tres cepas cada uno de ellos.

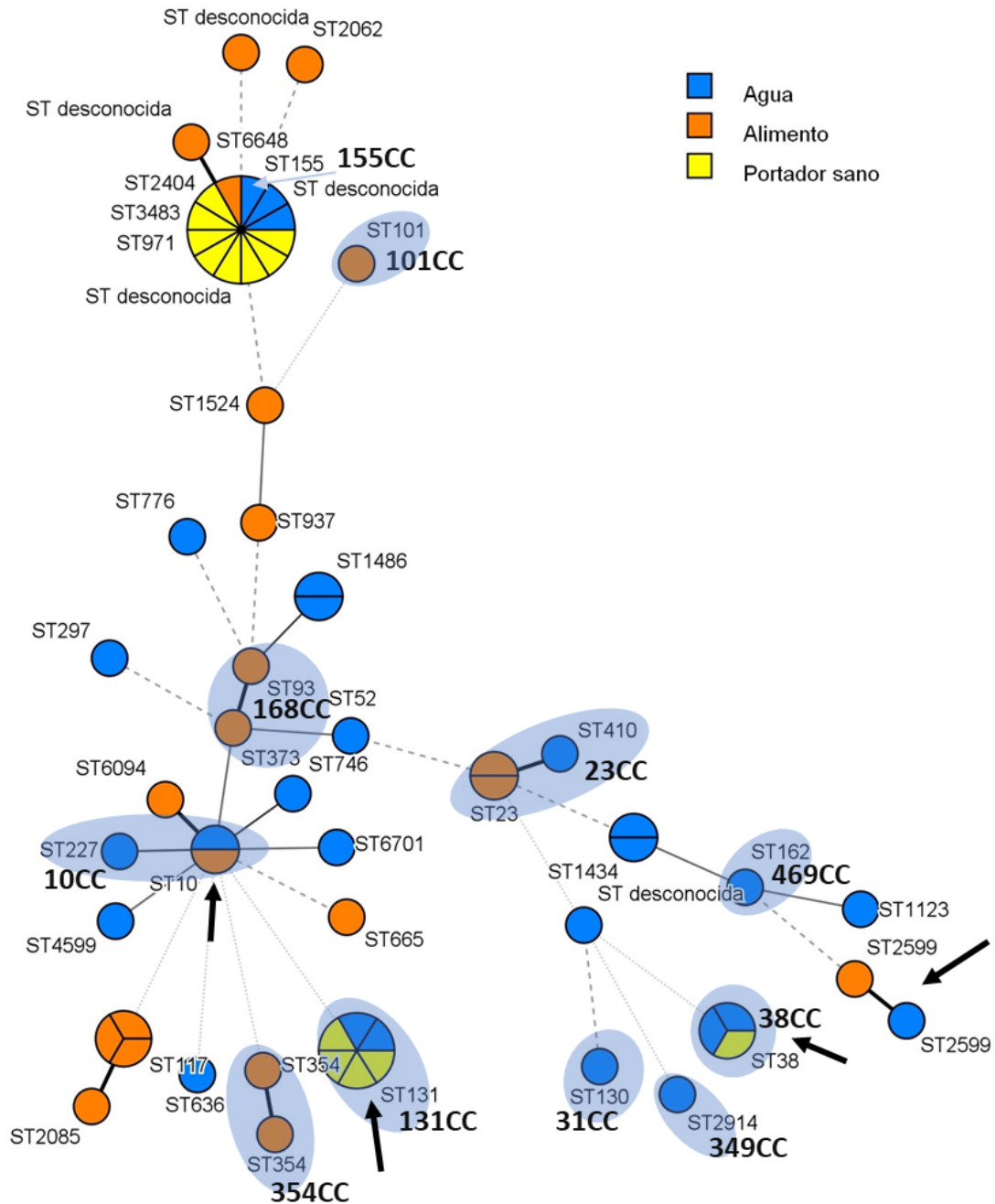


Figura 2.12. Composición clonal por MST de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE según la fuente de aislamiento. Cada círculo corresponde con una ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el origen de la muestra según se indica en la leyenda. Las áreas sombreadas indican los CC detectados que agrupan distintas ST. Las líneas de unión entre los distintos nodos (líneas negras, continuas, con guiones o punteadas) muestran el nº de alelos discordantes entre los perfiles de las cepas (1, 2, 3 y 4 alelos, respectivamente).

En la Figura 2.13, se muestra el mapa general de las distintas ST en relación con el tipo de β -lactamasa que produce cada cepa. Las relaciones filogenéticas se han establecido teniendo en cuenta el grupo CTX-M como gen *bla* principal cuando las cepas presentaban más de un tipo de β -lactamasa diferente. En el caso de presentar únicamente otro tipo de gen (SHV o TEM), estas se muestran en el árbol filogenético como “otras BLEEs” tal como indica la leyenda.

Las 6 cepas pertenecientes al complejo clonal 131CC (aisladas de aguas y portadores sanos) son productoras de *bla*_{CTX-M14} y *bla*_{CTX-M15} (o incluso de ambas β -lactamasas juntas), mientras que el complejo 38CC detectado en estos mismos ambientes, está relacionado con cepas productoras de *bla*_{CTX-M14} y *bla*_{CTX-M1}. En el caso de las cepas aisladas de aguas y alimentos pertenecientes al 10CC, éstas son productoras de *bla*_{CTX-M1} y *bla*_{CTX-M15}, como es el caso de las cepas pertenecientes al 23CC, que además incluye una productora de SHV-12. Por otro lado, las cepas agrupadas en el complejo 168CC son portadoras de *bla*_{CTX-M1}, a diferencia de las asociadas con 354CC que son productoras de otros tipos de β -lactamasas como *bla*_{SHV-12} o *bla*_{TEM-171}. De la misma manera, las cepas correspondientes al complejo 101CC, así como otras secuencias tipo (ST117, ST1524, ST937, etc) también son productoras de estos tipos de β -lactamasas. Finalmente, las cepas correspondientes con las secuencias tipo ST971, ST746, ST2404 y ST6094, así como otras desconocidas, son productoras de *bla*_{CTX-M14}.

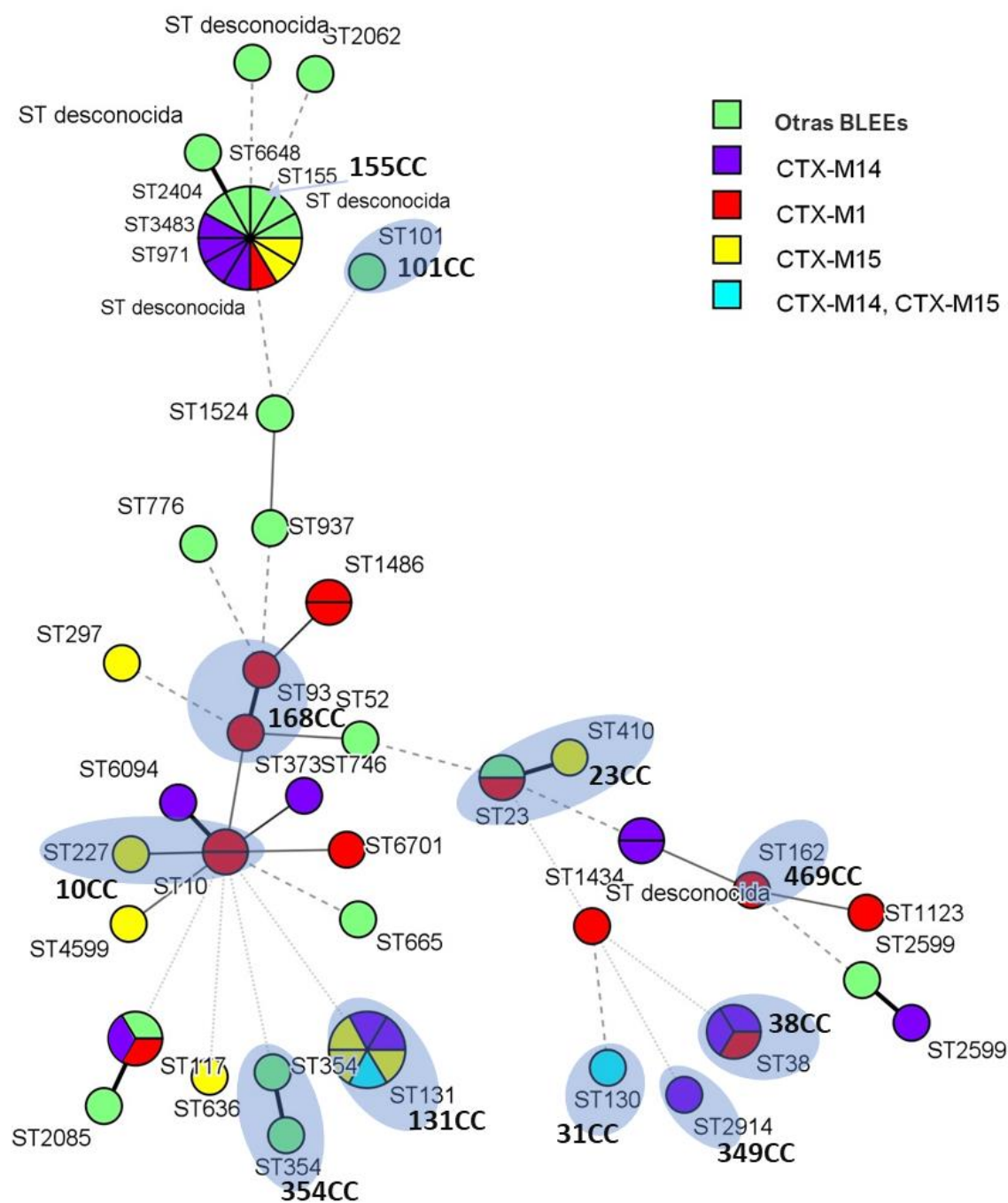


Figura 2.13. Composición clonal por MST de las 61 cepas de *E. coli* productoras de BLEE analizadas. Cada círculo corresponde con una ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el tipo de β -lactamasa producida por cada cepa, tal como se indica en la leyenda. Las áreas sombreadas indican los CC detectados que agrupan distintas ST. Las líneas de unión entre los distintos nodos (líneas negras, continuas, con guiones o punteadas) muestran el n° de alelos discordantes entre los perfiles de las cepas (1, 2, 3 y 4 alelos, respectivamente).

Finalmente, a modo de resumen, la Tabla 2.4 muestra todas las características filogenéticas determinadas en este capítulo, junto con los genes *bla* presentes en cada una de las cepas.

Tabla 2.4. Características filogenéticas de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de distintos entornos (azul=aguas; naranja= alimentos; amarillo=portador sano).

Complejo clonal (CC)	Secuencia tipo (ST)	β -lactamasa	Filogrupos	Nº Cepa	Origen
131CC	ST131	TEML-278, CTX-M14	B2	32	azul
		OXA-1, CTX-M15	B2	44	azul
		TEM-171, CTX-M14, CTX-M15	B2	53	amarillo
		TEM-171, CTX-M15	B2	56	azul
		TEM-171, CTX-M15	B2	57	azul
	CTX-M14	B2	58	amarillo	
	ST3483	CTX-M14	B2	59	amarillo
10CC	ST10	SHV-12, TEM-171, CTX-M-1	A	16	azul
		CTX-M1, SHV-12	A	35	azul
	ST227	TEML-278, CTX-M15	A	42	azul
38CC	ST38	TEML-278, CTX-M14	D	38	azul
		TEML-278, CTX-M14	D	39	azul
		TEML-171, CTX-M1	D	51	amarillo
23CC	ST23	CTX-M-1	C	4	azul
		SHV-12	Clade I o II	10	azul
	ST410	CTX-M15	C	25	azul
354CC	ST354	SHV-12	F	9	azul
168CC	ST373	SHV-12, TEM-171	F	13	azul
	ST373	CTX-M-1	A	7	azul
	ST93	SHV-12, CTX-M-1	A	14	azul
155CC	ST155	<i>mcr-1</i>	B2	48	azul
101CC	ST101	SHV-12, TEM-171	B1	3	azul
31CC	ST130	TEM-176, CTX-M15, CTX-M14	E	43	azul
349CC	ST2914	CTX-M14	D	33	azul
469CC	ST162	TEML-278, CTX-M1, SHV-12	B1	36	azul
NA	ST117	CTX-M-1	F	2	azul
		SHV-12	F	17	azul
		CTX-M14	F	18	azul
NA	ST1434	TEML-278, CTX-M14	B1	22	azul
		TEML-278, CTX-M14	B1	23	azul
NA	ST1486	CTX-M1	A	27	azul
		CTX-M1	A	28	azul
NA	ST2599	SHV-12, TEML-278	Desconocido	6	azul
		TEML-278, CTX-M14	B1	26	azul
	ST6648	SHV-12	A	1	azul
	ST2085	SHV-12	F	5	azul
	ST2062	SHV-12, TEM-171	Desconocido	8	azul
	ST665	SHV-12	A	12	azul
	ST937	SHV-12, TEM-171	B1	15	azul
	ST1524	ND	B1	19	azul
	ST6094	SHV-12, TEM-171, CTX-M-14	A	20	azul
	ST746	TEML-278, CTX-M14	A	24	azul
	ST6701	CTX-M1	A	31	azul
	ST636	CTX-M15	B2	34	azul
	ST1123	TEM-171, CTX-M1	B1	37	azul
	ST776	TEML-278, SHV-12	B1	29	azul
	ST4599	TEM-171, CTX-M15	A	41	azul
	ST297	CTX-M15	B1	46	azul
	ST52	TEML-278	A	45	azul
	ST971	TEM-116, CTX-M14	B1	49	azul
	ST2404	TEM-116, CTX-M14	A	50	amarillo
	NA	ST desconocida	SHV-12	A	11
TEML-278			B1	21	azul
TEML-278, CTX-M1			D	40	azul
ND			Desconocido	30	azul
CTX-M15			Desconocido	47	azul
TEML-171, CTX-M1			Desconocido	52	amarillo
CTX-M14			A	54	azul
TEM-171			A	55	amarillo
CTX-M15	C	60	amarillo		
ND	D	61	amarillo		

NA: no asociado con ningún complejo clonal conocido; ND: No detectado.

4. Discusión

Los datos obtenidos en este estudio muestran las relaciones filogenéticas existentes entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de distintos ambientes extrahospitalarios (entorno animal, ambiental y humano) en la Comunidad Foral de Navarra.

Los grupos filogenéticos prevalentes en alimentos han sido el A (33%), F (29%), B1 (19%), coincidiendo con la prevalencia observada en las cepas aisladas de aguas con la excepción del filogrupo F, que no ha sido detectado en entornos acuáticos (29% y 26%, grupos A y B1 respectivamente). Sin embargo, en portadores sanos el filogrupo prevalente ha sido el B2 (39%), seguido del A (23%) y D (15%). Se ha establecido una relación entre virulencia y filogenia en las cepas de *E. coli* basada en la mayoría de los casos en el estudio de los 4 principales grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) (Escobar-Páramo et al., 2004; Carlos et al., 2010). De esta manera, las cepas causantes de infecciones extraintestinales han sido asociadas con el filogrupo B2 y en menor medida con el D, mientras que las cepas comensales están asociadas con los grupos A y B1 (Massot et al., 2016). Sin embargo, según el último esquema actualizado por Clermont et al. (2013) los grupos se reestructuran de la siguiente forma: el grupo filogenético A se reclasifica en A y C; el grupo filogenético B2 incluiría a B2 y E, mientras que el D se puede dividir en D y F. Aunque esta nueva clasificación se describió hace unos años, todavía son pocos los estudios basados en la misma, por lo que no se dispone de mucha información acerca de las características y distribución de los nuevos filogrupos C, E, y F y los clados crípticos de *Escherichia* entre los distintos ecosistemas.

En esta línea, nuestros resultados coinciden con los publicados por Coura et al. (2015), quienes reportaron la prevalencia de grupos relacionados con cepas comensales (A, B1 y C) entre 149 aislados de aves de corral. Del mismo modo, Tansawai et al.

(2018), determinaron que la mayoría de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de aves (pollo, pato y aves de corral) pertenecían al grupo filogenético A (51%) y B1 (27,5%), reforzando la idea de la asociación de los filogrupos A, B1 y C con cepas comensales. En nuestro estudio hemos detectado estos tres filogrupos en todos los entornos estudiados, siendo los filogrupos A y B1 los más frecuentemente detectados en muestras procedentes de animales, al igual que describen Carlos et al. (2010). Por otro lado, hay que mencionar la presencia del nuevo filogrupo F en las cepas aisladas de productos procesados de pollo, ya que este filogrupo ha despertado recientemente interés por su asociación con cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) en humanos (Vangchhia et al., 2016; Johnson et al., 2017) y animales domésticos (Ewers et al., 2014; Guo et al., 2015). Sin embargo, carece de los rasgos de virulencia típicamente asociados con el filogrupo B2 causantes de infecciones extraintestinales (Johnson et al., 2017).

A diferencia de las cepas aisladas de alimentos, se han detectado los grupos más patógenos B2 y D tanto en entornos acuáticos como en portadores sanos, con una elevada prevalencia del filogrupo B2 en estos últimos (39%). Estos datos concuerdan con otros estudios (Fernández-Reyes et al., 2014; Merino et al., 2016), que además asocian estos grupos filogenéticos con cepas portadoras de *bla*_{CTX-M15}, coincidiendo con nuestros resultados (Figura 2.5). Ambos filogrupos se han asociado con infecciones del tracto urinario y bacteriemia en individuos inmunodeprimidos (Coque et al., 2008). Además, en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación en la Comunidad Foral de Navarra, también se detectó la presencia del filogrupo D en cepas de aguas residuales y ríos (Ojer-Usoz et al., 2015).

Se ha descrito que las cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo filogenético E son más prevalentes en el tracto gastrointestinal de mamíferos silvestres que en humanos

(Clermont et al., 2013; Massot et al., 2016; Mercat et al., 2016), lo que concuerda con nuestros resultados, ya que este filogrupo solamente ha sido detectado en entornos acuáticos, con los que los mamíferos silvestres han podido tener un estrecho contacto. Al mismo tiempo, un 5% de las cepas aisladas de alimentos se clasificaron como clados crípticos de *Escherichia*, es decir, cepas bioquímicas y fenotípicamente idénticas de *E. coli* pero genéticamente distantes. Los clados crípticos de *Escherichia* se definieron en 2009 por Walk et al., (2009) y aunque existen muy pocos estudios al respecto, parecen corresponder con cepas mejor adaptadas al entorno natural (especialmente los Clados II-IV), como agua, suelos o sedimentos (Luo et al., 2011). Así, los animales podrían actuar como huéspedes ocasionales de este filogrupo por su estrecho contacto con el entorno natural (Clermont et al., 2011). La mayoría de las cepas crípticas de *Escherichia* se caracterizan por niveles de resistencia y virulencia más bajos (excepto el *Clado* I). Los datos obtenidos en el estudio de los patrones de resistencias (MicroScan) de la cepa aislada en este trabajo, revelan la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, monobactams, tetraciclinas y algún tipo de quinolonas, además de ser portadora del gen *bla_{SHV-12}*. Dado que la resistencia a estos grupos de antibióticos, así como la presencia de genes *bla*, también está relacionada con el *Clado* II (Kondratyeva et al., 2020), serían necesarios más estudios para caracterizar si esta cepa corresponde al *Clado* I o II.

Por otro lado, los estudios de MLST revelaron la presencia de múltiples ST y 11 CC bien definidos entre las 61 cepas analizadas. Entre las cepas de alimentos, la secuencia tipo ST117 fue la más prevalente. Aunque hasta la fecha esta ST no está asociada con ningún complejo clonal conocido, está bien caracterizada por ser la causa de la colibacilosis aviar (APEC "*Escherichia coli* patógena aviar") (Mora et al., 2012). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que todas las cepas ST117 asociadas con el filogrupo F y portadoras de genes *bla_{CTX-M1}*, *bla_{CTX-M14}* y *bla_{SHV-12}*, han sido aisladas de

muestras de pollos, de forma similar a lo descrito por Ben Said et al. (2015). Igualmente, en este trabajo se ha detectado el complejo 168CC (asociado al filogrupo A) en dos cepas productoras de *bla*_{CTX-M1} y *bla*_{SHV-12} aisladas de alimentos, coincidiendo con estudios anteriores en la misma región (Ojer-Usoz et al., 2015). El complejo 354CC ha sido observado en dos cepas de alimentos asociadas con el filogrupo F y al igual que en el trabajo de Guo et al. (2015), ambas son resistentes a quinolonas. Este hecho resulta relevante, ya que esta resistencia se encuentra estrechamente relacionada con el uso de quinolonas en aves de corral (Savin et al., 2020), especialmente pollos, de donde provienen la mayoría de muestras alimentarias analizadas. Al mismo tiempo, destaca la presencia del complejo clonal 10CC (asociado con el filogrupo A) en pollo y aguas, coincidiendo con los resultados publicados por otros autores que determinaron la diversidad de este complejo clonal en entornos alimentarios y ambientales (Oteo et al., 2009; Belmar Campos et al., 2014; Ojer-Usoz et al., 2017). Aunque este complejo clonal se encuentra comúnmente asociado con cepas de bajo poder virulento, se ha relacionado con infecciones humanas y cepas productoras de BLEE con variantes pertenecientes a los grupos *bla*_{CTX-M1}, *bla*_{CTX-M2} y *bla*_{CTX-M9} en distintos ecosistemas (Griffin et al., 2012). En nuestro estudio, estas tres cepas de *E. coli* 10CC son portadoras de *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-171}, *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-15} y, además de ser resistentes a antibióticos β-lactámicos, también lo son a otras familias de antibióticos (Tabla 2.1). Por otro lado, el 23CC que ha sido bien caracterizado y se encuentra diseminado por varios ambientes tal como demuestran otros investigadores (Ben Said et al., 2015; Manges et al., 2019), se ha detectado en tres cepas: dos perteneciente al filogrupo C-*bla*_{CTX-M} y otra al *Clado* I o II-*bla*_{SHV-12}. En relación con otras secuencias tipo detectadas únicamente en ríos, la ST1434 se asoció con el filogrupo B1 y con la diseminación de genes *bla*_{CTX-M14}. De la misma forma, la asociación de esta secuencia tipo con la

resistencia a β -lactámicos y carbapenems, fue descrita previamente por Piedra-Carrasco et al. (2017), en otros ríos del norte de España. En el caso de ST1486, en este trabajo se ha visto relacionada con el filogrupo comensal A y genes *bla*_{CTX-M1}, sin embargo Zhang et al. (2019), observaron la presencia de este complejo clonal en cepas aisladas de cerdo. Por otro lado, la cepa resistente a colistina, positiva para el gen *mcr-1* y aislada del colector de un matadero de conejos, se ha visto que pertenece al complejo clonal 155CC y filogrupo B2, coincidiendo con los resultados de Jamborova et al. (2015), que determinaron que las cepas asociadas a este complejo han sido frecuentemente relacionadas con infecciones en el ganado y fauna silvestre en Europa.

En general, uno de los complejos clonales más prevalentes ha sido el 131CC (11,5% *n*=6), asociado con cepas más virulentas relacionadas con el filogrupo B2 (Bajaj et al., 2015; Mathers et al., 2015) y que se ha constituido como uno de los clones pandémicos más importantes en la rápida emergencia global de las enzimas *bla*_{CTX-M15} y en menor medida *bla*_{CTX-M14} (Rogers et al., 2011; Nicolas-Chanoine et al., 2014). Como se puede observar en la Tabla 2.4, todas las cepas asociadas con este complejo han sido aisladas de portadores sanos y entornos acuáticos y son portadoras de este tipo de enzimas. Por último, otro de los complejos clonales detectados en estos mismos entornos ha sido el 38CC (5%), que comprende otro de los linajes importantes relacionados con la diseminación de genes BLEE/AmpC entre el entorno humano, ganadero y ambiental (Dorado-García et al., 2018). En esta misma línea, las cepas asociadas con este complejo se relacionaron con el filogrupo D, perteneciente a cepas virulentas y fueron portadoras de genes *bla*_{TEM-171}, *bla*_{CTX-M14} y *bla*_{CTX-M1}.

En definitiva, el gran número de filogrupos, secuencias tipo y complejos clonales determinados manifiesta la gran diversidad genética existente entre las poblaciones de *E. coli*. Tal y como hemos visto, se han encontrado STs y CCs que

constituyen clones importantes relacionados con la diseminación de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos. Además, éstos han sido comunes entre los distintos entornos, sugiriendo una diseminación de resistencias entre nichos ambientales, animales y humanos. En concreto, las cepas de origen acuático, especialmente las cepas aisladas de estaciones depuradoras de aguas residuales, son las que más frecuentemente muestran perfiles idénticos a cepas aisladas de otros entornos, poniendo en el punto de mira la importancia que adquieren las aguas en la diseminación de resistencias bacterianas. Por todo ello, resulta indispensable establecer medidas y programas de vigilancia, que incluyan la detección de clones pandémicos entre los distintos ambientes. En concreto, a pesar de que los complejos 10CC y 23CC están asociados con filogrupos comensales (A y C, respectivamente), su detección en muestras del entorno animal y alimentario podría ser considerada como una posible alerta de diseminación de resistencias, debido a la relación que tienen con genes *bla*_{CTX-M1} y *bla*_{CTX-M15}. Por otro lado, sería muy valioso determinar la presencia de marcadores con gran relevancia clínica en entornos acuáticos, como son los clones pandémicos 131CC y 38CC. En este caso, la selección de estos clones como marcadores radica en su relación con cepas patógenas pertenecientes a los filogrupos B2 y D respectivamente, así como la asociación con genes *bla*_{CTX-M14} y *bla*_{CTX-M15}.

Objetivo 2



INVESTIGACIÓN: Estudio de la difusión de resistencias a antibióticos β -lactámicos: caracterización de elementos genéticos móviles, factores de virulencia y capacidad conjugativa.

CONTEXTO

Tal como señala una de las líneas estratégicas propuestas por el Plan Nacional de Resistencias a antibióticos (PRAN), resulta indispensable controlar la difusión de las bacterias resistentes a los antibióticos, especialmente aquellas bacterias con mecanismos de resistencia transferibles o emergentes en nuestro territorio, entre los distintos ecosistemas (humano, animal y medio ambiente). Por ello, hemos querido abordar este objetivo centrándonos en el estudio de los elementos génicos móviles y capacidad conjugativa de 150 cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas previamente de diferentes entornos en la Comunidad Foral de Navarra.

Para comprender mejor los mecanismos de propagación de la resistencia de estas bacterias, en el **Capítulo 3** se ha llevado a cabo la caracterización de integrones y secuencias de inserción, dado su papel relevante en la adquisición y diseminación de genes de resistencia *bla*. Aunque están implicados varios mecanismos genéticos en la diseminación de estos genes y elementos, la transferencia génica horizontal a través de mecanismos de conjugación es la vía más frecuente de transmisión de resistencias. De esta forma, en el **Capítulo 4** se ha estudiado la capacidad conjugativa que presentan estas cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Al mismo tiempo, la adquisición de distintos factores de virulencia a través de estos mecanismos proporciona una vía evolutiva hacia la patogenicidad. Por ello, en dicho capítulo, también se han determinado los perfiles genéticos asociados a factores de virulencia, con el fin de lograr una mejor comprensión de la patogenicidad y diseminación de resistencias a antibióticos β -lactámicos a través de los distintos entornos.

Capítulo 3



Caracterización de elementos genéticos móviles en cepas de
E. coli productoras de BLEE

Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Pérez-Etayo, L.; Berzosa, M.; González, D.; Vitas, A.I. Prevalence of integrons and insertion sequences in ESBL-producing *E. coli* isolated from different sources in Navarra, Spain (2018). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15. doi:10.3390/ijerph15102308 (Anexo I).

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) has become a public health problem, reaching alarming levels in many parts of the world (WHO, 2014; Roca et al., 2015). In recent years, resistances in the Enterobacteriaceae family have increased significantly because of the extensive use of antibiotics in human treatment, veterinary, and agriculture, leading to the selection and global spread of resistant clones (Shaikh et al., 2015; Liu et al., 2017). In particular, the dissemination of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) have increased dramatically in the recent years, becoming a serious global threat (Sikkema and Koopmans, 2016; Ojer-Usoz et al., 2017).

Several genetic mechanisms have been involved in the acquisition and dispersion of antimicrobial resistances. The commonly called “mobilome” (Medini et al., 2005; Tettelin et al., 2008) is composed of a variety of mobile genetic elements (MGEs), including plasmids, transposons (Tn), insertion sequences (IS), integrons (*intI*), and introns. Conjugation, transformation, and transduction are the main mechanisms for the horizontal transfer of MGEs (Norman et al., 2009; Woodford et al., 2011).

Integrons are DNA elements capable of capturing gene cassettes (including antimicrobial resistance genes) and disseminating them using an MGE (Stokes and Hall, 1989). Integrons are usually composed of two conserved segments (termed 5'-conserved region [5'-CS] and 3'-conserved region [3'-CS]) separated by a variable region which contains the gene cassettes. The 5'-CS end includes (i) the *int* gene coding for an integrase, that belongs to a distinct family of the tyrosine-recombinase; (ii) a primary recombination site (*attI*); and (iii) a promoter (Pc), which ensures the transcription of the cassette genes. On the other hand, the 3'-CS region is formed by (i) a truncated gene of resistance to quaternary ammonium compounds (*qacE Δ I*); (ii) a

sulfonamide resistance gene (*sul1*); and (iii) an unknown function sequence (*orf5*) (Galani et al., 2006). Class 1 (*int11*) and class 2 (*int12*) integrons are the most commonly involved in antibiotic resistances, while limited work has shown the presence of class 3 (*int13*) in Enterobacteriaceae (Fluit and Schmitz, 2004; Saenz et al., 2004; Machado et al., 2005; Odetoyn et al., 2017; Kaushik et al., 2018). The gene *int13* was reported for the first time in a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* strain (Arakawa et al., 1995) and has been also detected in *Klebsiella pneumoniae* isolates (Correia et al., 2003) and other Enterobacteriaceae (Rizk and El-Mahdy, 2017).

In addition, *bla* ESBL genes have been associated with insertion sequences. These IS are the smallest transposable elements (<2.5 kb), and are classified into families according to different characteristics, with transposases (enzymes that catalyze the IS movement) being the main classification system used (Mahillon and Chandler, 1998; Zhao and Hu, 2013). It has been well documented that IS26, *ISEcp1*, *ISCR1*, and *IS903*, in association with class 1 integrons, are the elements most commonly involved in the antimicrobial resistance to β -lactamics (Arduino et al., 2002; Eckert et al., 2006; Diestra et al., 2008; Cullik et al., 2010; Cheng et al., 2016).

Therefore, the investigation of these elements might be critical, in order to predict the potential spread of ESBL-producing strains. In this context, the aim of this study was to evaluate the presence of different types of integrons (*int11*, *int12*, and *int13*) and insertion sequences (*ISEcp1*, IS26, *ISCR1*, and *IS903*) in a collection of 150 ESBL-producing *E. coli* isolated from different sources in Navarra, Spain.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

A total of 150 ESBL-producing *E. coli* were selected from a wide collection of ESBL-producing Enterobacteriaceae, isolated in Navarra from different environments: food products ($n=48$), farms and feed ($n=20$), rivers and wastewater treatment plants [WWTPs] ($n=33$) and human origins, including healthy volunteers ($n=13$) and hospital inpatients ($n=36$). Clinical isolates from hospital inpatients were provided by Clínica Universidad de Navarra and were collected from January 2009 to December 2012 (Ojer-Usoz et al., 2017). Food and environmental samples were collected from different locations in Navarra in two sampling periods [2010–2013 (Ojer-Usoz et al., 2013, 2014, 2017); 2015–2016 (Vitas et al., 2018) and, finally, isolates from healthy people were collected from September 2015 to September 2016 (González et al., 2019)]. All samples were already identified, and phenotypically and genotypically characterized, in order to know the antimicrobial susceptibility pattern, the types of β -lactamase genes, and the phylogenetic group (Ojer-Usoz et al., 2013, 2014; Vitas et al., 2018). Isolates were selected according to the following criteria: they must show multidrug-resistant phenotype (to at least three different classes of antimicrobials) and must carry at least one ESBL gene. The main characteristics of the selected isolates, regarding type of ESBL, are shown in Table 3.1. Resistance profiles and complete information of each isolate is presented in the Supplementary Material (Tables S3.1–S3.6).

Table 3.1. Genotypic characteristics of extended spectrum β lactamase (ESBL) producing *E. coli* according to their origin (Ojer-Usoz et al., 2013, 2014, 2017; Vitas et al., 2018).

Sample Origin	Percentages of detected <i>bla</i> genes					
	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{TEM-42}	<i>bla</i> _{TEML-171}	<i>bla</i> _{SHV-12}
Hospital inpatients	41.7	61.1	8.3	11.1	NA	5.5
Healthy people	46.2	30.8	15.4	0	46.2	0
WWTP and rivers	33.3	30.3	18.2	6	NA	6
Food	32.7	4.1	18.3	12.3	31.8	35.6
Farms and feed	31.6	5.26	47.4	26.3	5	21

*NA: not analysed

2.2. DNA Extraction and Detection of Integrons

DNA extraction was performed with DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen, Barcelona, Spain), using a pre-treatment protocol for Gram-negative bacteria, and following the manufacturer’s instruction. The quantity and quality of the DNA was analyzed using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Detection of class 1, class 2, and class 3 integrons in ESBL-producing *E. coli* was performed by using PCR, as described by Mazel et al. (2000), with the primers shown in Table 3.2.

Table 3.2. Primers used for the detection of integrons.

Primer	Forward sequence (5´-3´)	Amplicon size (pb)	T (°C) ³	GenBank accession n°
<i>Int11</i> -Fw ¹	GGTCAAGGATCTGGATTTTCG	483	62	U49101
<i>Int11</i> -Rv ²	ACATGCGTGTAATCATCGTC	483	62	U49101
<i>Int12</i> -Fw	CACGGATATGCGACAAAAGGT	789	62	L10818
<i>Int12</i> -Rv	TAGCAAACGAGTGACGAAATG	789	62	L10818
<i>Int13</i> -Fw	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	600	60	D50438
<i>Int13</i> -Rv	TGTTCTTGTATCGGCAGGTG	600	60	D50438

¹Fw: forward; ²Rv: reverse; ³T (°C): annealing temperature.

DNA amplification was performed in a DNA thermal cycler GeneAmp® PCR system 2700 (Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25 μ L containing 2 μ L of DNA extract mixed with 2.5 μ L of 10x buffer (Bioline, London, UK), 5 μ L of dNTPs (Bioline, London, UK), 1.5 μ L of MgCl₂ 50 mM (Bioline, London, UK), 2 μ L of each primer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and 1.5 U of Inmolase™ DNA polymerase (Bioline, London, UK). The conditions of the

amplification were as follows: initial denaturation at 94°C for 10 min, followed by 30 cycles of DNA denaturation at 94°C for 45 s, primer annealing at 62°C (*intI1* and *intI2*) or 60°C (*intI3*) for 35 s, primer extension at 72°C for 2 min, and a final elongation at 72°C for 7 min. Positive and negative controls (Saenz et al., 2004) were included in all PCR assays, and 1 kb ladder (Invitrogen) was used as a molecular size standard. After amplification, PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gel in 1x TBE buffer, stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination. *E. coli* C828, *K. pneumoniae* C933 (provided both by Centro de Investigación Biomédica de la Rioja) and *E. coli* isolated from hospital inpatients, confirmed as carrying *intI2* by DNA sequencing, were used as positive controls for *intI1*, *intI3*, and *intI2*, respectively.

2.3. Detection of Insertion Sequences

DNA extracts were examined for the detection of different insertion sequences associated with ESBL genes, performing PCRs assays using the specific primers and conditions showed in Table 3.3 (Poirel et al., 2003; Eckert et al., 2006; Novais et al., 2006).

The PCRs were performed in a final volume of 25 µL containing 2 µL of DNA extract mixed with 2.5 µL of 10x buffer (Bioline, London, UK), 5 µL of dNTPs (Bioline, London, UK), 1.5 µL of MgCl₂ 50 mM (Bioline, London, UK), 2 µL of each primer (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), and 1.5 U of Inmolase™DNA polymerase (Bioline, London, UK), in a DNA thermal cycler GeneAmp® PCR system 2700 (Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA). Amplification conditions were modified in order to improve the specificity using an initial denaturation at 94°C for 12 min, followed by 35 cycles of DNA denaturation at 94°C for 1 min, and primer annealing temperature depending on the IS (Table 3.3), primer extension at 72°C for 2 min, and a final elongation at 72°C for 10 min. PCR products were separated by

electrophoresis on 1% agarose gels and were visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

Table 3.3. Primers and conditions used for the amplification of insertion sequences

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (pb)	T (°C) ³	GenBank accession N°	Reference
ISEp1-Fw ¹	ATCTAACATCAAATGCAGG	1381	60	AJ972954	(Eckert et al., 2006)
ISEp1-Rv ²	AGACTGCTTCTCACACAT	1381	60	AJ972954	(Eckert et al., 2006)
IS26-Fw	TCACTCCACGATTTACCGCT	557	61	AF205943	(Eckert et al., 2006)
IS26-RV	CTTACCAGGCGCATTTCGCC	557	61	AF205943	(Eckert et al., 2006)
ISCR1-Fw	TCGCTGCGAGGATTGTCATC	1100	60	AF174129	(Novais et al., 2006)
ISCR1-Rv	CTCGCTTGAGGCGTTGCAT	1100	60	AF174129	(Novais et al., 2006)
IS903-Fw	CATATGAAATCATCTGCGC	473	56	EU056266	(Poirel et al., 2003)
IS903-Rv	CCGTAGCGGGTTGTGTTTTTC	473	56	EU056266	(Poirel et al., 2003)

¹Fw: forward; ²Rv: reverse; ³T (°C): annealing temperature.

2.4. Sequence Analysis

Amplicons obtained in the different PCRs were sequenced to confirm the presence of integrons and insertion sequences. Bidirectional DNA sequence analysis was performed by the MacroGen EZ-Seq purification service (MacroGen Europe, Amsterdam, The Netherlands). Searches for DNA and protein homologies were carried out using the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLAST program and the alignment of DNA and amino acids sequences were performed using Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.5. Statistical Analysis

The results were subjected to statistical processing with the SPSS 15 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), applying the chi-square test with a level of significance of $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Distribution of Integrons in ESBL-Producing *E. coli*

The occurrence and types of integrons, according to the isolate origin, is presented in Figure 3.1. As expected, class 1 showed the highest dissemination, being present in 92% of the isolates ($n=138$) and in all environments, without significant differences among them ($p < 0.05$). Class 1 integrons have been reported as the most ubiquitous type among enteric bacteria (Hall and Collis, 1995; Machado et al., 2008; Deng et al., 2015). In a similar way, Solberg et al. (2006) reported the presence of class 1 integron in 70% of *E. coli* causing community-acquired infections.

According to Roe et al. (2003), the occurrence of class 1 integrons in healthy people suggests a possible acquisition of resistance genes circulating in different environments by a constant horizontal exchange of these genes. By contrast, class 2 integron were found in only 13 strains (8.5%), in accordance with the study of Ozgumus et al. (2009), who found this class of integron in pathogenic, environmental, and commensal *E. coli* with a lower frequency than class 1. Finally, *intI3* was not detected, similarly to the report by Vinué et al. (2008). In fact, few studies describe the presence of class 3 integron in *E. coli* (Kargar et al., 2014; Kaushik et al., 2018) and, to date, there are no published data reporting the presence of this integron in ESBL-producing *E. coli* isolated from Spain.

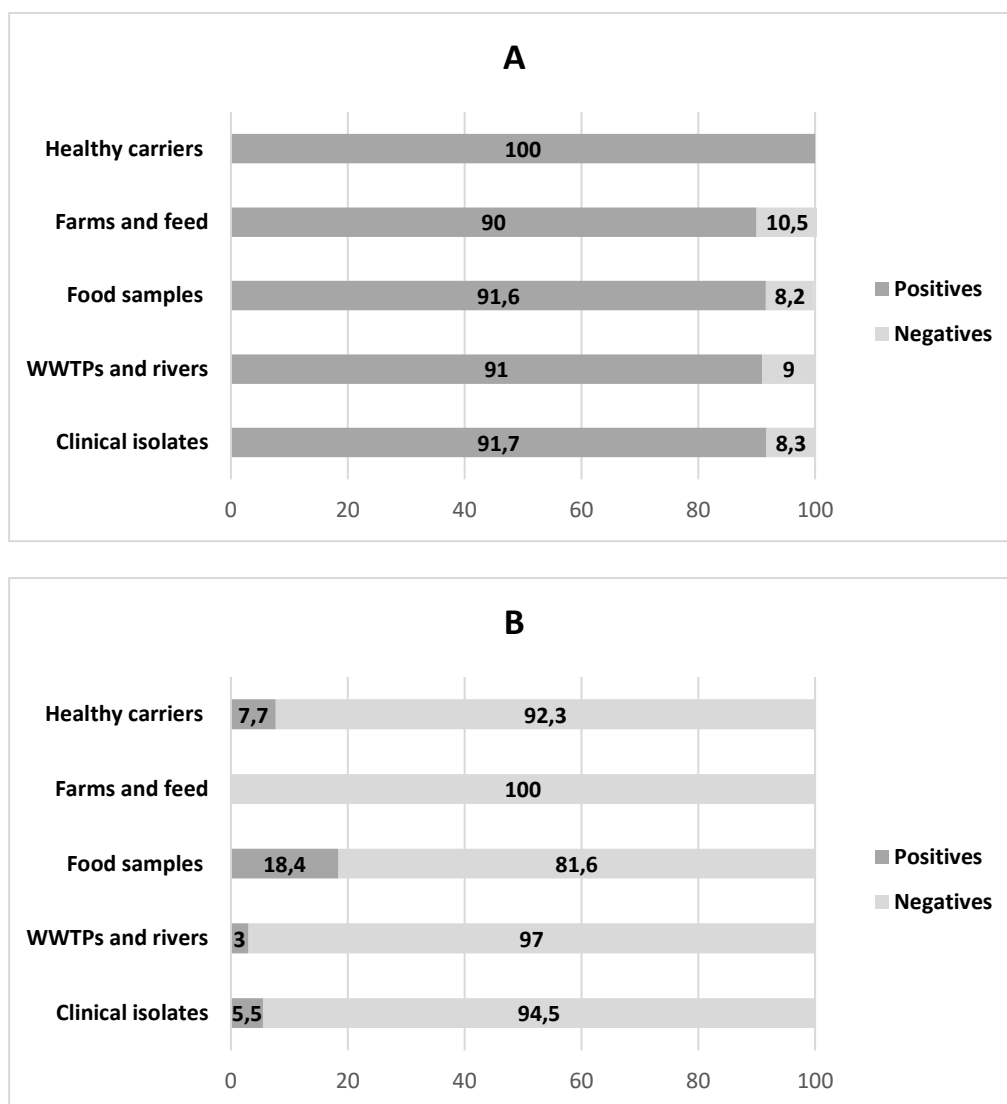


Figure 3.1. Prevalence (percentages) and distribution of class 1 and class 2 integrons in ESBL-producing *E. coli* according to their origin. (A) *intI1*; (B) *intI2*.

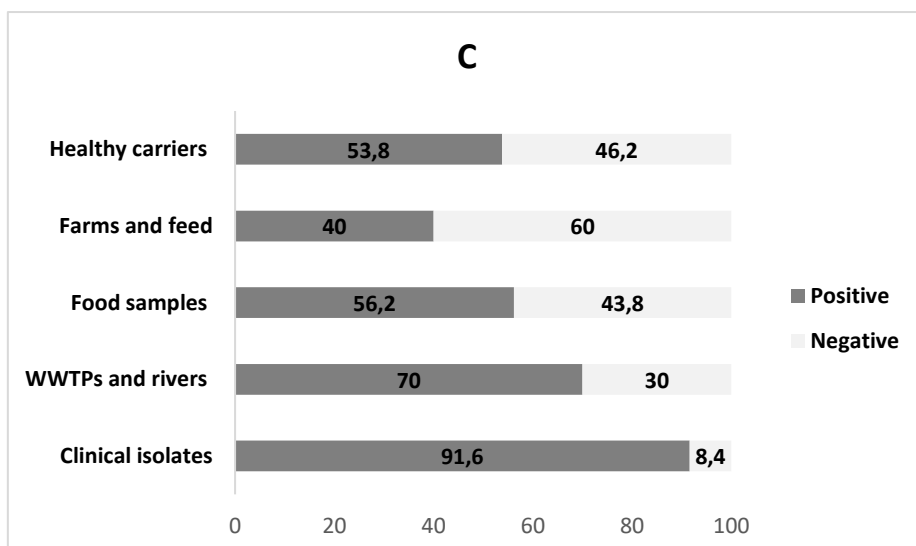
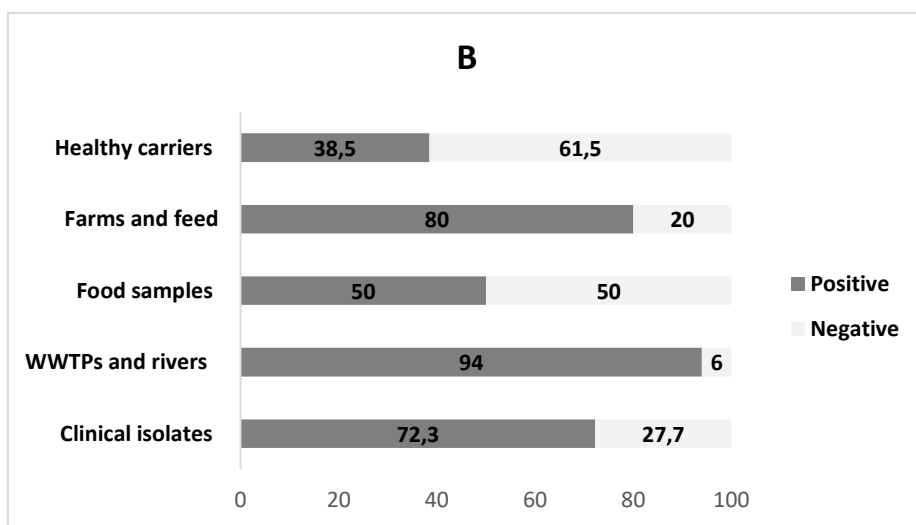
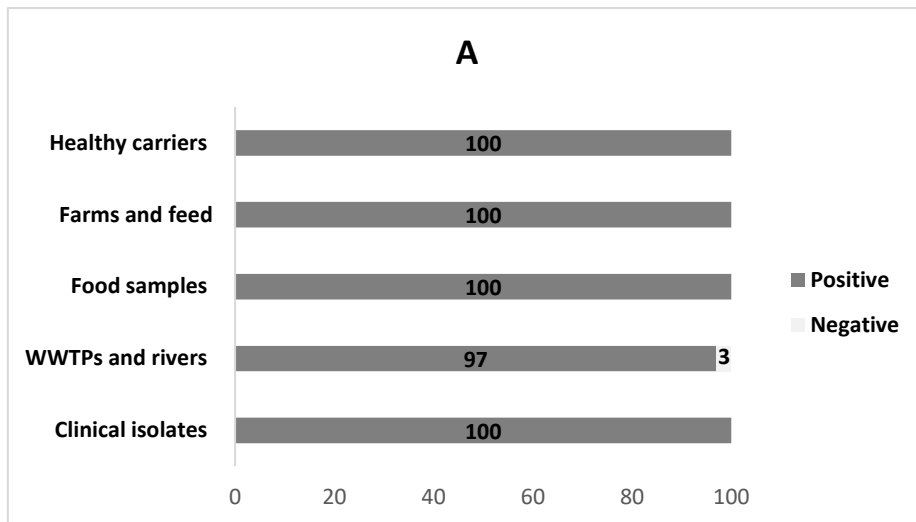
It should be noted that *intI2* was mainly detected in food isolates (18.4%), but not in farming environments ($p = 0.044$). This situation seems a little bit contradictory, but it could be due to the low number of isolates coming from farms and feed ($n=20$), compared with food ($n=48$). Probably, if we extended the study by increasing n , we would find positive results for this type of integron, as shown in the literature. In any case, our results are comparable to those obtained by Goldstein et al. (2001) who demonstrated the presence of class 1 and class 2 integrons in food, livestock, and water contaminated with farm animal feces. In a similar way, *intI2* has been detected in poultry products (Roe et al., 2003).

In addition, it is remarkable that *intI1* and *intI2* coexist in 8% of the isolates (92.1% of those carrying *intI2*). Rizk et al. (2017) reported the co-existence of more than one type of integron in 36.9% of isolates, and a prevalence of 38% was reported by Kargar et al. (2014) in a study performed in 69 multidrug-resistant (MDR) *E. coli*. By contrast, Kor et al. (2013) found only one isolate carrying both integrons among clinical isolates, and Odetoyn et al. (2017) reported a prevalence of 2.4% in fecal *E. coli* isolated from mother-child pairs in Nigeria. The simultaneous existence of multiple integrons represents a great threat for the dissemination of antimicrobial resistance genes among Enterobacteriaceae (Mazel et al., 2000).

3.2. Analysis of Insertion Sequences

The most prevalent type was IS26 (99.4%), followed by *ISEcp1* (68%) and IS903 (65.3%), while *ISCR1* was detected only in 19 isolates (12.6%). The wide presence of IS26 in almost all multidrug-resistant isolates suggests that this IS is specifically carried by ESBL expressing strains, rather than being characteristic of the MDR genotype

The four insertion sequences were present in all environments (Figure 3.2), except *ISCR1*, that was not detected in farm and feed. This latest result contrasts with the reported by Ali et al. (2016), that showed the connection between *ISCR1* and *intI1* in strains isolated from diverse dairy farms in China. However, the wide dissemination of IS among different niches has been reported by other authors. For instance, Cullik et al. (2010) showed the association between *bla_{CTX-M}* with the common elements *ISEcp1*, IS26, and IS903, in ESBL-producing *E. coli* isolated in a German Hospital. The *ISEcp1* type has been detected in clinical isolates from Korea, and in isolates from healthy or diseased food-producing animals, including swine and avian (Kim et al., 2011; Liao et al., 2015).



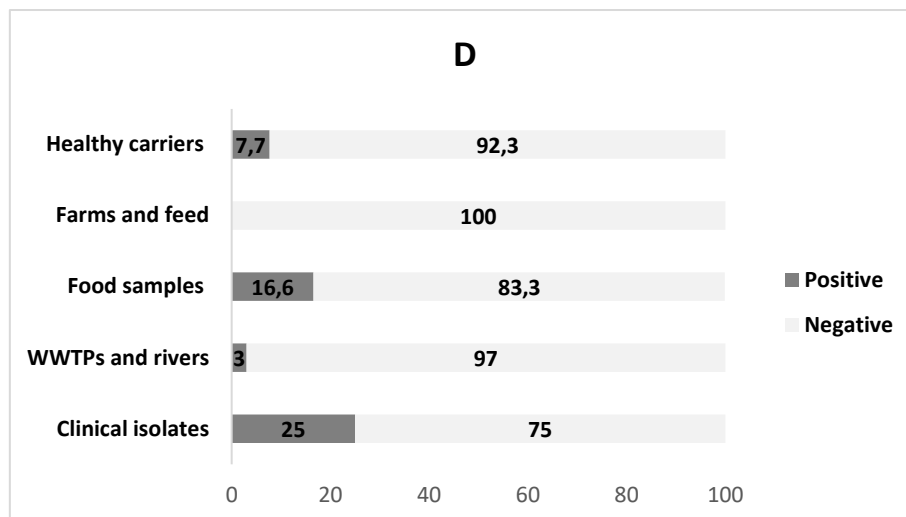


Figure 3.2. Prevalence (percentages) and distribution of insertion sequences in ESBL-producing *E. coli* according to their origin. (A) IS26; (B) *ISEcp1*; (C) IS903; (D) ISCR1.

In addition, the frequent co-existence of several insertion sequences in the same strain has been observed in the present work, in agreement with other studies (Eckert et al., 2006; Bae et al., 2008; Diestra et al., 2008; Cullik et al., 2010). Genetic patterns are presented in Figure 3.3, showing that the majority of isolates carried two or three IS (42% and 40.7%, respectively), whereas 10% of them carried only one. The three prevalent genetic patterns were IS26–*ISEcp1*–IS903 ($n=55$), IS26–*ISEcp1* ($n=33$), and IS26–IS903 ($n=28$) (37%, 22%, and 19%, respectively). The combination IS26–*ISEcp1* has been related with the pathogen clone ST131 (Cullik et al., 2010; Wang et al., 2015), and it was present in 4 isolates coming from healthy people ($n=2$) and hospital inpatients ($n=2$), that could suppose a possible risk situation for the population in general. Finally, it is remarkable that 7.3% of isolates contain the four IS (*ISEcp1*–IS26–IS903–ISCR1), a situation that, to our best knowledge, is being described in the literature for the first time. These isolates come mainly from hospital inpatients ($n=9$), but we also found the genetic patterns in isolates from a river ($n=1$) and from a chicken hamburger ($n=1$). In summary, these results show the complexity of mobile genetic

elements, and suggest the facility to acquire different mechanisms to disseminate resistance genes through all environments.

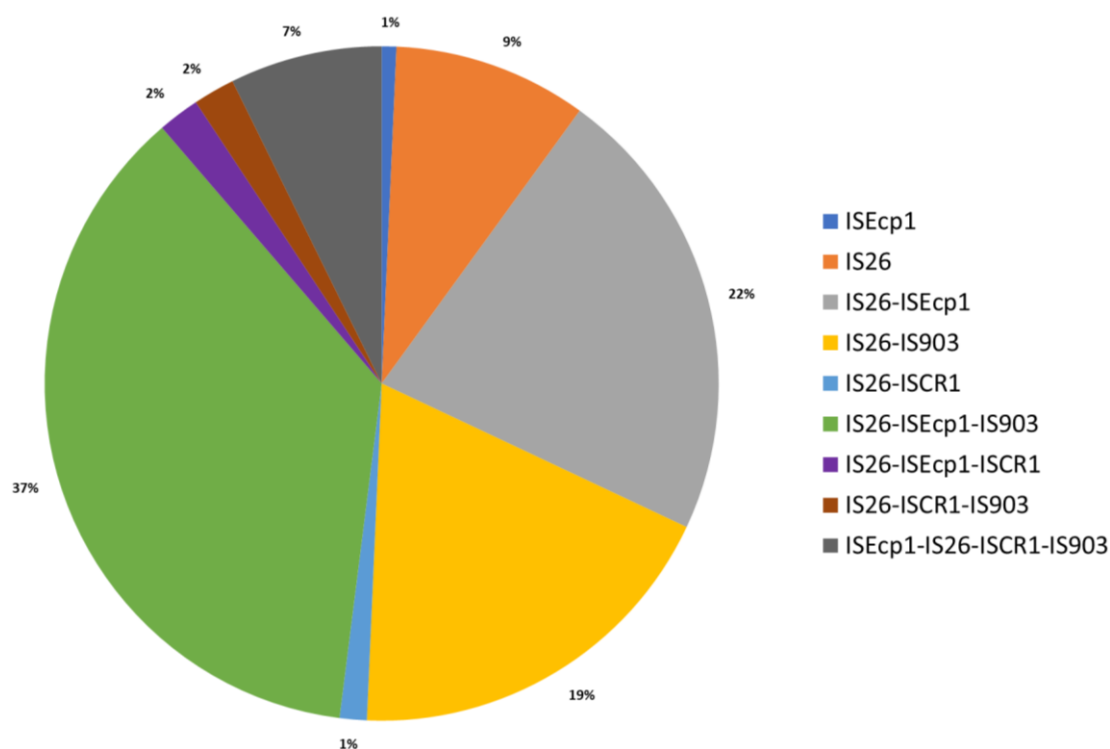


Figure 3.3. Genetic patterns and prevalences among the studied ESBL-producing *E. coli*.

3.3. The Important Role of Horizontal Genetic Elements in the Dissemination of ESBLs

Correlation between the presence of certain genetic elements and ESBL has been reported by several authors (Cullik et al., 2010; Leverstein-van Hall et al., 2011; Kiiru et al., 2013), and our results support this fact (Table 3.4). IS26 have been observed flanking the open reading frame (orf) regions of β -lactamase genes (Porse et al., 2016), and prevalences higher than 94% in all ESBL types were observed in this study. Similar results were detected in a study carried out in Kenya with 27 *E. coli* strains obtained from hospitalized patients, in which over 40% of isolates carrying *bla*_{TEM-52}, *bla*_{SHV-5}, or *bla*_{CTX-M-14}, were linked to the IS26 (Kiiru et al., 2013). Otherwise, Billard-Pomares et al. (2014) reported the characterization of a P1 bacteriophage from an ESBL-*E. coli*

strain which had acquired two foreign DNA fragments, one of them being a fragment mobilized by two IS26 elements containing a *bla_{SHV-2}* gene. Finally, Doi et al. (2014) reported the relationship between OXA and IS26 downstream of a class 1 integron in a *K. pneumoniae* strain. In summary, our observations confirm those of Cullik et al. (2010), who highlighted the important role of IS26 in the spread of resistance genes.

Table 3.4. Percentage of insertion sequences and integrons among the different types of ESBL-*E. coli* producers.

<i>bla</i> Genes	IS26	IS903	ISEcp1	ISCR1	int11	int12
<i>bla_{CTX-M}</i>	99.2	90.3	79	11.3	94	6.5
<i>bla_{TEM}</i>	100	89.9	88.5	16	94	7.3
<i>bla_{OXA-1}</i>	94.5	83.3	50	5.5	100	0
<i>bla_{SHV}</i>	100	56.5	26	0	95.7	21.8

Similarly, *ISEcp1*-like insertion sequences have been observed upstream of orfs encoding members belonging to the CTX-M-1, CTX-M-2, and CTX-M-9 clusters. Kim et al. (2011) found the association of *ISEcp1* and CTX-M in clinical isolates, especially in strains containing CTX-M-14 (in agreement with the 37% observed in our study). A similar association was found in China by Sun et al. (2010) in healthy and sick pets. In addition, Tamang et al. (2013) reported that 97.6% *bla_{CTX-M}* genes (isolated from cattle, farm workers, and the farm environment) possessed the insertion sequence *ISEcp1* upstream of *bla_{CTX}*. On the other hand, our results show that 9 out of 102 isolates carrying *ISEcp1* (isolated from WWTP, river, farm soil and feed) were disrupted by IS26. Similar findings have been reported in a German University Hospital (Cullik et al., 2010), where cases of *ISEcp1* disrupted by an intact IS26 were detected. In the same way, Wang et al. (2015) detected a truncated copy of *ISEcp1* gene with an IS26 gene being located upstream in 3 out of 9 ESBL-producing *E. coli* isolated from fecal samples of food producing animals and healthy humans. Finally, despite the lower prevalence of *ISCR1* observed in the present study (12.6%), the aforementioned IS is

another important element in the genetic platforms associated with the dissemination of CTX-M genes (Rodriguez-Martinez et al., 2006; Toleman et al., 2006a; Zhao and Hu, 2013). In general, *ISCR1* has been associated with CTX-M-2 and CTX-M-9 subtypes (Toleman et al., 2006a, 2006b; Millan et al., 2012), but the majority of our strains carrying this IS were CTX-M-14 and CTX-M-15 producers. That could explain the low number of strains carrying *ISCR1*. Moreover, *ISCR1* mediates the formation of a complex with class 1 integrons (Arduino et al., 2002; Toleman et al., 2006a). From the total of isolates carrying *ISCR1*, 94.7% carried *intI1*, and even one of them contained both integrons (*intI1* and *intI2*). However, due to the wide presence of *intI1* (92% of isolates), we have not found a specific association between the isolates containing this IS and the different ESBLs. On the other hand, CTX-M-14 was present in the 46% of the isolates containing *intI2* (a percentage identical to that of SHV-12 carrying clones), whereas TEM and CTX-M-1 were detected in 38.5% and 15.4%, respectively, of *intI2* carriers.

Moreover, it must be pointed out that *ISEcp1-IS903* is known as one of the major genetic platforms of resistance-gene-exchange (Eckert et al., 2006; Sun et al., 2010; Zhao and Hu, 2013). Our results showed that *IS903* and *ISEcp1* were present in 55 isolates in co-existence with *IS26* (*IS26-ISEcp1-IS903*). Similarly, a recent report detected this genetic platform (Liao et al., 2015) in CTX-M-14-producing *E. coli* isolated from animals (Wang et al., 2015). Furthermore, all the analyzed strains show multidrug-resistant (MDR) phenotype, which means that they are resistant to at least three different classes of antimicrobials (Ojer-Usoz et al., 2013, 2014). Similar results were reported by Woodford et al. (2009) that found the plasmid pEK499 harboring 10 genes that confer resistance to eight antibiotic classes and also carrying IS (*IS26* and *ISEcp1*).

Finally, Table 3.5 summarizes the relationship between the number of IS present in the same isolate, and the number of ESBL types produced by each microorganism. It can be observed that as the number of ESBL enclosed in the same genetic environment increases, the number of insertion sequences present also increases.

Table 3.5. Relationship between number of IS in each isolate and the number of expressed ESBLs.

Number of IS in Each Isolate	N Isolates	N Isolates (%) Producing			
		1 ESBL	2 ESBL	3 ESBL	4 ESBL
1	15	46.6	40	0	0
2	63	46	46	8	0
3	61	49	41	8.2	1.6
4	11	0	81.8	18.2	0

To sum up, all the MDR ESBL-producing *E. coli* analyzed in the present study carried at least one genetic element (integron and IS). Since the strains were isolated from different sources (clinical isolates, healthy carriers, farms and feed, food samples, WWTPs and rivers), these data revealed the potential risk for the dissemination of antimicrobial resistances among environmental and human bacteria.

In conclusion, this study highlights the high prevalence of different elements mediating horizontal gene transfer among ESBL-producing *E. coli* isolates from food, environmental, and human samples. The analysis of integrons showed that *intI1* was present in the majority of strains and in all sources, while the prevalence of *intI2* was lower but remarkable in the food isolates. Concerning insertion sequences, the multiple associations, like IS26-ISEcp1, are relevant. Thus, the co-existence of diverse types of integrons and insertion sequences suggest possible risk for the dissemination of resistance genes among different environments. Therefore, additional investigations regarding the genetic composition of these components are encouraged, to understand the role of these mobile elements in the spread of multidrug-resistant bacteria.

Capítulo 4



Caracterización de factores de virulencia y capacidad conjugativa en cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *Microorganisms*. Pérez-Etayo, L; González, D.; Vitas, A.I. “The aquatic ecosystem, a good environment for the horizontal transfer of antimicrobial resistance and virulence-associated factors among extended spectrum β -lactamases producing *E. coli*” (2020). *Microorganisms* 2020, 8, 568. (Anexo I).

1. Introduction

E. coli is one of the main causative agents of gastrointestinal and extra intestinal infections. This ubiquitous organism is a major element of the normal commensal microbiota in the human and animal intestinal tract and it has been found in soil, food, water, and vegetation (Kaczmarek et al., 2018). The ability of *E. coli* to cause a variety of infectious diseases, such as sepsis, pneumonia, or urinary tract infections, is associated with the expression of specific virulence factors (VFs). In addition, the multidrug resistance profile of *E. coli* strains increases the risk of antimicrobial treatment failure in both humans and animals (Zogg et al., 2018).

Resistance to antibiotics can occur by different processes, like the acquisitions of antimicrobial resistance genes (ARGs) via horizontal gene transfer (HGT). Several genetic mechanisms have been involved in the spread of ARGs, but conjugation is thought to have the greatest influence (Von Wintersdorff et al., 2016). Furthermore, it has been reported that *E. coli* obtains antimicrobial resistance faster than other microorganisms (Ben Yahia et al., 2018). It is especially relevant regarding the increase of β -lactam resistance in *E. coli* due to the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL). Mobile Genetics Elements (MGSs) are able to spread ESBL encoding genes by horizontal transfer to others Gram-negative bacteria (Kim et al., 2018).

Likewise, it is believed that the acquisition of several virulence factors via horizontal gene transfer provides an evolutionary pathway to pathogenicity (Chapman et al., 2006). VFs are important at the initial stages of infection (when the bacteria have to adapt to the host environment) and include adhesins (FimA, PapC, and PapG allele III), toxins (HlyA and Cnf1), and other proteins like siderophores (Aer) (Lüthje and Brauner, 2014). In the case of adherent structures, *fimA* encodes the major structural subunit of

type 1 fimbriae and it is present in almost all *E. coli* strains and other members of the Enterobacteriaceae family (Farfán-García et al., 2016). However, *papC* and *papG* encode adhesin molecules that are found in P fimbriae and are especially linked to uropathogenic strains (Karami et al., 2017). Regarding toxins, *cnf1* encodes for cytotoxic necrotizing factor type 1, a toxin secreted by some virulent strains associated with neonatal meningitis and urinary infections (Fabbri et al., 2010). On the other hand, expression of HlyA (cytotoxin hemolysin A or α hemolysin) correlates with the increased severity observed in infections due to uropathogenic strains with enhanced potential to cause kidney damage and bacteremia (Bielaszewska et al., 2014).

Previous studies performed by our research group (Ojer-Usoz et al., 2013, 2014; Pérez-Etayo et al., 2018; Vitas et al., 2018; González et al., 2019) have provided us with a great collection of multidrug resistant ESBL-producing *E. coli* strains isolated from human, animal, food and water environments in Navarra (Spain). The objective of the present study was to investigate the mechanisms responsible for antibiotic resistance dissemination. To this end, we aimed to determine (i) the virulence gene profiles of the strain collection and (ii) the ability of the ESBL-producing *E. coli* strains to mediate horizontal gene transfer.

2. Materials and Methods

2.1 Strain Collection

From our own collection of ESBL-producing Enterobacteriaceae isolated in Navarra (Spain) from different sources, a total of 150 *E. coli* strains were selected for the study: human origin (including healthy volunteers [$n=13$] and clinical cases [$n=36$]), food products ($n=48$), farms and feed ($n=20$), and rivers and wastewater treatment plants [WWTPs] ($n=33$). Having taken into account the available data from previous characterization (Ojer-Usoz et al., 2017; Pérez-Etayo et al., 2018; Vitas et al., 2018), the following criteria were considered for the selection of strains: to show a multidrug resistant pattern (MDR), to carry different types of β -lactamase genes and belonging to different phylogenetic groups according to Clermont et al. (2013) or different sequence types (including the ST131) following the scheme described by Wirth et al. (2006). Complete information of each strain (including the virulence genes and conjugation frequencies determined in this work) is presented in the supplemental material (Figures S4.1–S4.5).

2.2 Virulence Factor Gene Detection and Sequence Analysis

DNA extraction of the selected strains was performed with DNeasy[®] Blood & Tissue kit (Qiagen, Barcelona, Spain), using a pre-treatment protocol for Gram-negative bacteria and following the manufacturer's instruction. The quantity and quality of DNA was analyzed using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). *E. coli* DNA extracts were tested by conventional PCR using the specific primers and conditions showed in Table 4.1, for the presence of VF genes that mediate adhesion (fimbrial adhesion genes, *fimA*, *papC*, and *papG* allele III), toxins (α -haemolysin *hlyA* and cytotoxic necrotizing factor *cnf1*) and siderophores (*aer*) (Yamamoto et al., 1995; Ruiz et al., 2002).

Table 4.1. Primers and conditions used for the amplification of virulence factors genes.

Target	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	T ³ (°C)	Reference
<i>fimA</i>	fimA-Fw ¹	GTTGTTCTGTCCGGCTCTGTC	447	55	Ruiz et al., 2002
	fimA-Rv ²	ATGGTGTGGTTCCGTTATTC			
<i>papGIII</i>	papG-Fw	CATTTATCGTCCTCAACTTAG	482	55	Ruiz et al., 2002
	papG-Rv	AAGAAGGGATTTTGTAGCGTC			
<i>papC</i>	papC-Rw	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	382	63	Yamamoto et al., 1995
	papC-Rv	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA			
<i>aer</i>	aer-Fw	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	63	Yamamoto et al., 1995
	aer-Rv	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG			
<i>hlyA</i>	hlyA-Fw	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1117	63	Yamamoto et al., 1995
	hlyA-Rv	ACCATATAAGCGGTCATTCGCGTCA			
<i>cnfI</i>	cnfI-Fw	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG	498	63	Yamamoto et al., 1995
	cnfI-Rv	CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT			

¹ Fw: forward; ² Rv: reverse; ³ T (°C): annealing temperature.

Amplicons obtained were sequenced by the Macrogen EZ-Seq purification service (Macrogen Europe, Madrid, Spain) to confirm the presence of VF genes. Searches for DNA and protein homologies were carried out using the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), using the BLAST program. Alignment of DNA and amino acids sequences was performed using Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.3 Conjugation Assay

Conjugative transfer of ESBL genes among selected *E. coli* strains was studied using the mixed broth method (Vaidya, 2011) as shown in Figure 4.1.

E. coli DSM 9036 was used as a recipient strain. This strain is plasmid-free, streptomycin-resistant, and sensitive to β -lactams antibiotics (*F*-, *thr-1*, *ara-14*, *leuB6*, *Delta(gpt-proA)62*, *lacy,1 tsx-33*, *qsr*-, *supE44*, *galK2*, *lambda- rac*-, *hisG4(Oc)*, *rfbD1*, *mgl-51*, *rpsL31*, *kdgK51*, *xyl-5*, *mtl-1*, *argE3(Oc)*, *thi-1*). As donor strains, we selected only those sensitive to streptomycin ($n=70$). The donor and recipient strains were grown in BHI (Scharlab, Barcelona, Spain) at a concentration of approximately 1.0×10^9 CFU/mL (overnight cultures, 37°C). Equal volumes (5 mL) of cultures of the donor and the recipient strains were mixed (1:1) and incubated for 24 h at 37°C. Transconjugants

were selected on TSA agar (Scharlab) supplemented with streptomycin (100 µg/mL) and ampicillin (30 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), to inhibit the growth of recipient and donors strains, respectively. After the incubation period (24 h at 37°C), the number of colonies (CFU) was counted. Conjugation frequencies were expressed as the number of CFU of transconjugants relative to the number of CFU of donors. All experiments were performed in triplicate.

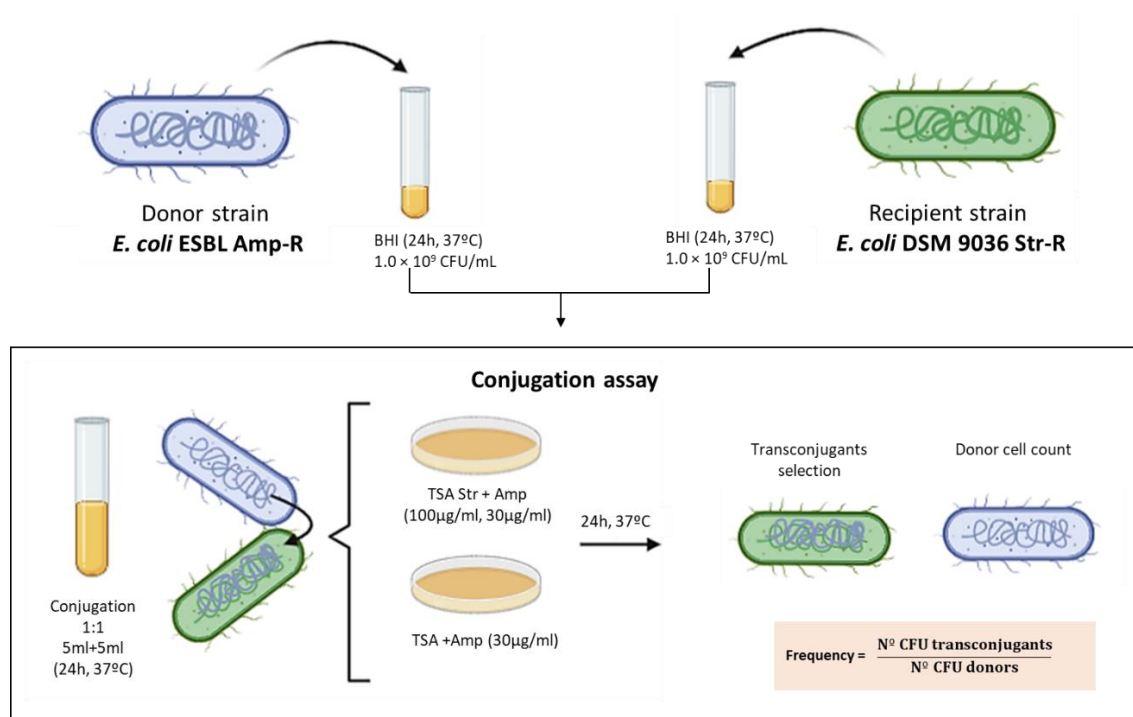


Figure 4.1. Mixed broth conjugation method

Finally, the molecular characterization of the transconjugants was performed by PCR amplification of the genes involved in the resistances (*bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM}) (Colom et al., 2003; Woodford et al., 2006).

2.4 Statistical Analysis

The results were subjected to statistical processing with the SPSS 15 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), applying the Chi-square (X^2) and ANOVA test with a level of significance of $p < 0.05$.

BioNumerics, version 7.6 (Applied Maths NV/bioMérieux, Sint-Martens-Latem, Belgium) was used to create the Multi-Dimensional Scaling (MDS) graphs. They were generated based on a distance matrix calculated by the Pearson correlation and unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) functions.

2.5 Informed Consent and Ethical Statement

Informed consent was obtained in all cases prior to collecting the samples (from parents in the case of participating children), using a template approved by the Ethical Committee Research of the University of Navarra (27 Jul 2018) (González et al., 2019).

3. Results

3.1. Prevalence of Virulence Factors Genes

Overall, all the isolates tested were positive for one or more VF genes (Figures S6.1-S6.5). In fact, the co-occurrence of several VFs in the same strain was frequent and most of the isolates contained two or three virulence genes (40.7% and 36%, respectively). Among the 150 tested strains, the genes encoding FimA (97.3%), Aer (72%) and PapC (60%) were the most commonly found and were detected in all studied environments (Table 4.2). Regarding *fimA*, the prevalence in farms and feed was significantly lower ($p < 0.05$) than that found in clinical cases and food products. Furthermore, the occurrence of *aer* in clinical samples was significantly higher than in rivers and WWTPs, food products, and healthy volunteers' isolates. In contrast, the prevalence of *papC* was very variable and differed significantly ($p < 0.05$) in each ecological niche with respect to the others.

Table 4.2. Prevalence of virulence-associated genes among extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* from different sources.

Gene	Number of Isolates (%)					
	Clinical Cases	Healthy Volunteers	Food Products	Farms and Feed	Rivers and WWTPs	Total
<i>fimA</i>	36 (100) ^a	13 (100)	48 (100) ^b	17 (85) ^{a,b}	32 (97)	146 (97.3)
<i>papG III</i>	4 (11.1)	0	2 (4.1)	0	0	6 (4)
<i>papC</i>	30 (83.3) ^{c,d}	13 (100) ^{g,i}	24 (50) ^{d,e,h,i}	18 (90) ^{f,h}	5 (15.2) ^{c,e,f,g}	90 (60)
<i>aer</i>	33 (91.6) ^{j,k,l}	9 (69.2) ^l	28 (58.3) ^k	15 (75)	23 (69.7) ^j	108 (72)
<i>hlyA</i>	2 (5.5)	0	0	0	1 (3)	3 (2)
<i>cnf1</i>	5 (13.8)	0	0	0	3 (9)	8 (5.3)

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l: Same letters represents statistically significant values ($p < 0.05$) in pairwise comparisons.

It is remarkable that the only strains that were found to carry all VF genes were those of clinical origin. In addition, those strains contain a greater number of virulence factors compared to those from the rest of the environments, but none of the isolates carried all the 6 studied genes. The three strains containing the *hlyA* gene (2%) were the only ones that presented 5 virulence factors (positive for *fimA*, *aer*, *papC*, *cnf1*, and

hlyA). Likewise, the co-occurrence of *fimA-aer-papC* and *fimA-aer* was the most frequently reported (36% and 25.3%, respectively) (Figure 4.2).

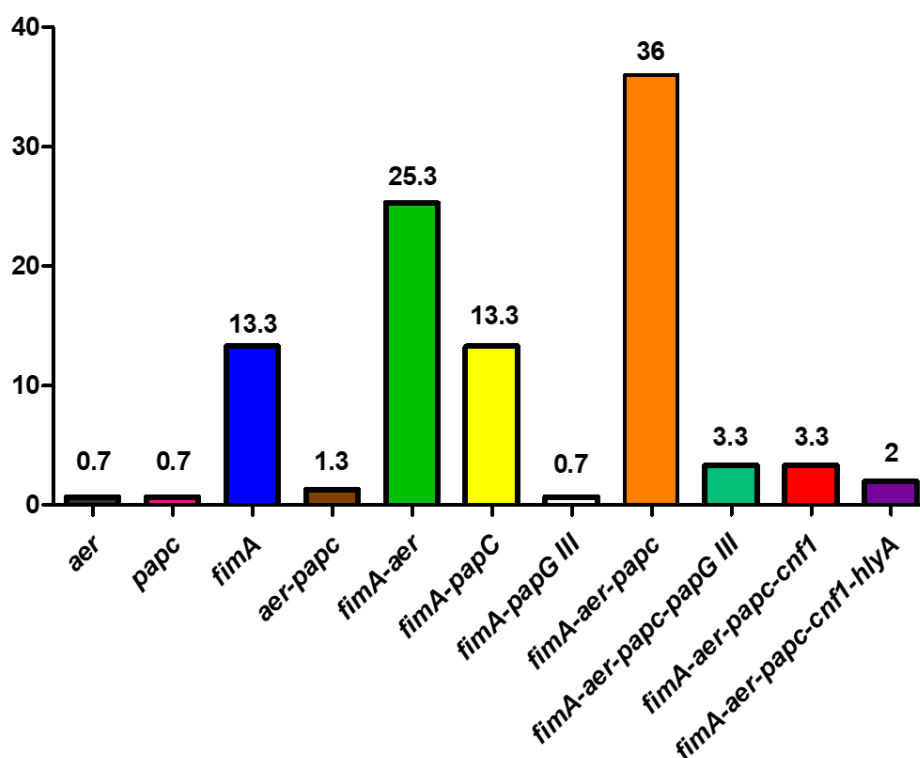


Figure 4.2. The co-occurrence (percentages) of several virulence factors (VFs) in ESBL-producing *E. coli*.

3.2 Distribution of Virulence Genes among the Phylogenetic Groups

All the virulence genes were present among phylogroups B2 and B1 and most of them were detected in phylogenetic groups A and D (Table 4.3). It must be pointed out that gene toxins were found almost exclusively in A, B1, B2, and D groups. Adhesin PapC and toxin HlyA were more prevalent in group B2 compared to the group D, in which the highest prevalence of toxin gene *cnf1* was found.

From the total of strains showing the ST131 ($n=16$; all of them isolated from clinical cases and healthy volunteers), the vast majority (68.8%) were positive to *aer*, *papC*, and *fimA* (Figures S6.1 and S6.5). Furthermore, one clinical isolate ST131 was positive for 5 out of the 6 VF (*fimA*, *aer*, *papC*, *cnf1* and *hlyA*).

Table 4.3. Distribution of virulence genes among phylogenetic groups of ESBL-producing *E. coli*.

VF	Gene	Number of isolates (% of total)							
		A (n=44)	B1 (n=27)	B2 (n=30)	D (n=36)	C (n=3)	F (n=6)	Clade I (n=1)	Unknown (n=3)
Adhesins	<i>fimA</i>	43 (97.7)	27 (100)	28 (93.3)	35 (97.2)	3 (100)	6 (100)	1 (100)	3 (100)
	<i>papC</i>	24 (54.4)	16 (59.3)	25 (83.3)	21 (58.3)	2 (66.6)	1 (16.6)	-	1 (33.3)
	<i>papG III</i>	2 (4.5)	1 (3.7)	1 (3.3)	2 (5.5)	-	-	-	-
Siderophore	<i>aer</i>	25 (56.8)	17 (63)	24 (80)	32 (88.8)	3 (100)	6 (100)	-	1 (33.3)
Toxins	<i>hlyA</i>	-	1 (3.7)	2 (6.6)	-	-	-	-	-
	<i>cnf1</i>	1 (2.27)	1 (3.7)	2 (6.6)	4 (11.1)	-	-	-	-

Additionally, the multidimensional scaling graphs (MDS) showed in Figure 4.3 demonstrate that the 150 strains were homogeneously grouped according to the source of isolation (Figure 4.3A). Likewise, it can be seen that the *hlyA* and *cnf1* positive strains (Figure 4.3B, C) are strongly related, being very close in the variable space (X, Y and Z axis).

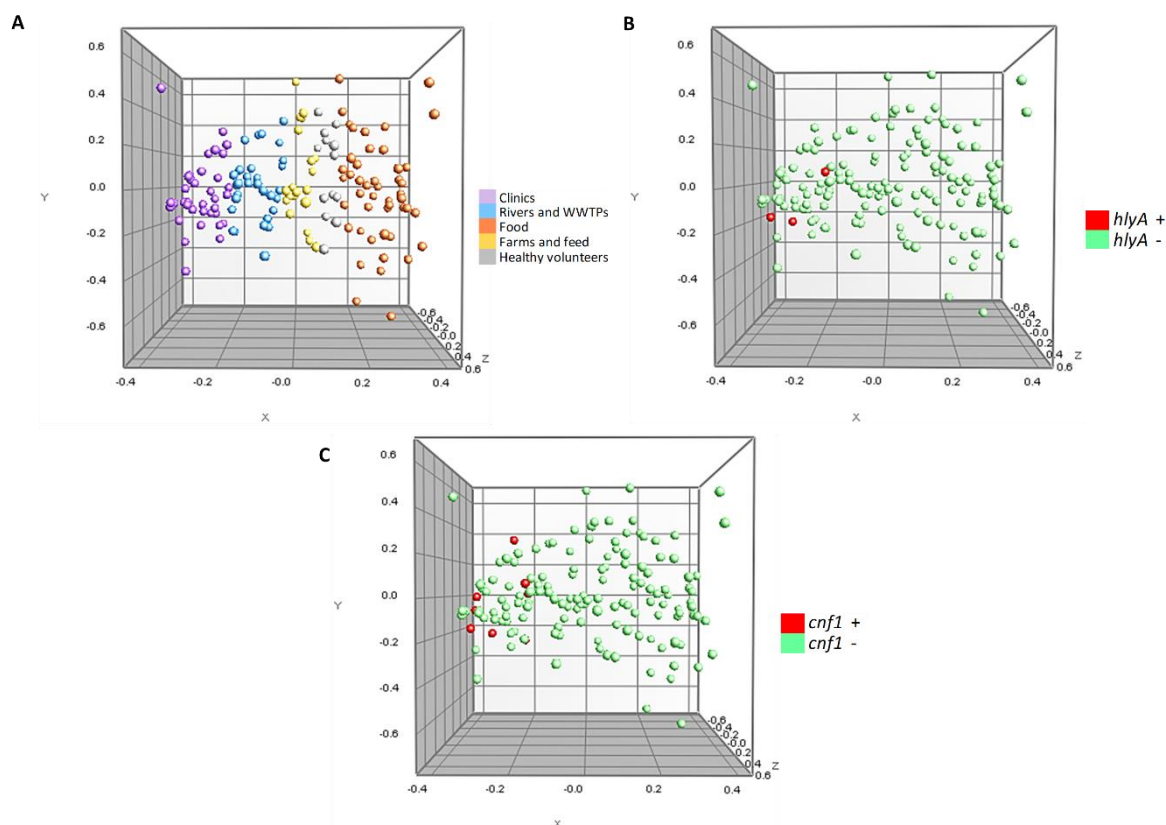


Figure 4.3. Multidimensional scaling graphs (MDS) for the 150 strains. (A) According to origin; (B) *hlyA* positive and negative strains (C) *cnf1* positive and negative strains.

3.3 Horizontal Transfer of ESBL Genes

The 100% of the tested ESBL-producing *E. coli* strains ($n=70$) were able to perform an efficient gene transfer, making the recipient strain (*E. coli* DSM 9036) resistant to ampicillin. Although the range of conjugation rates is nearly the same in samples from all origins, it was observed that strains isolated from aquatic environments showed significantly higher conjugation frequency values ($p < 0.05$), with an average value of $1.15 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$ (Table 4.4). In fact, the highest value was observed in a strain coming from a WWTP ($2.35 \pm 8.51 \times 10^{-2}$), which confirms the potential risk of dissemination of ARG through these environments. On the other hand, the isolates from farms and feed and food products showed lower frequencies, with an average value of $1.53 \times 10^{-4} \pm 2.85 \times 10^{-4}$ and $9.61 \times 10^{-4} \pm 1.96 \times 10^{-3}$, respectively.

Table 4.4. Conjugation frequencies of ESBL-producing *E. coli* according to their origin.

Origin	Conjugation Frequency Average \pm Sd	Conjugation Frequency Range
Rivers and WWTPs	$1.15 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$	$2.35-3.37 \times 10^{-6}$
Healthy volunteers	$3.38 \times 10^{-2} \pm 4.20 \times 10^{-2}$	$4.81 \times 10^{-2}-2.28 \times 10^{-6}$
Clinical cases	$2.64 \times 10^{-3} \pm 5.82 \times 10^{-3}$	$1.19 \times 10^{-2}-9.08 \times 10^{-7}$
Farms and feeds	$1.53 \times 10^{-4} \pm 2.85 \times 10^{-4}$	$1.03 \times 10^{-4}-9.14 \times 10^{-7}$
Food products	$9.61 \times 10^{-4} \pm 1.96 \times 10^{-3}$	$1.16 \times 10^{-3}-3.59 \times 10^{-7}$

Figure 4.4 shows the MDS of the 18 strains tested in the conjugation assays belonging to phylogroup B2 (associated with more virulent strains). These strains are closely associated, grouping homogeneously according to the source of isolation. Likewise, half of the isolates belong to ST131 and 39% of them are capable of performing a conjugation with a frequency range between >1 and $< 1 \times 10^{-4}$. In particular, it can be seen that 1 WWTPs isolate and 6 strains of human origin (clinical cases and healthy volunteers) have a high conjugation frequency. In addition, Figure 4.4D shows the occurrence of the virulence factor *papC* within this phylogroup.

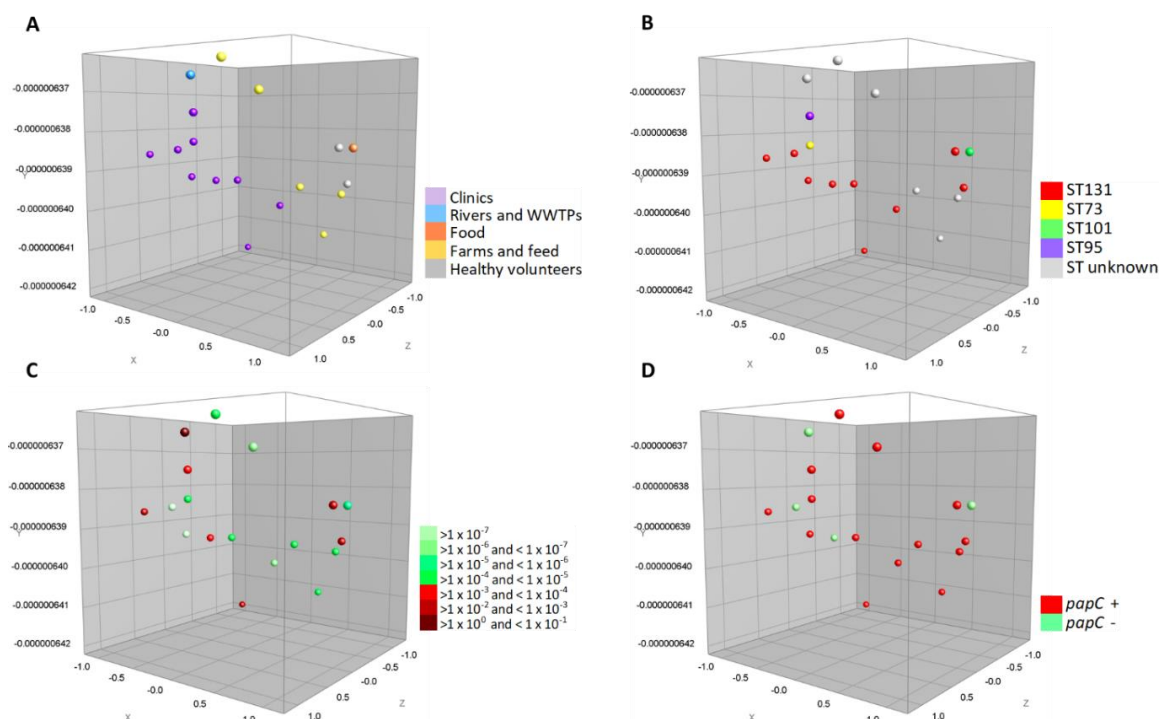


Figure 4.4. Multidimensional scaling graphs (MDS) for the 18 isolates B2, tested in the conjugation assays; (A) According to the distribution by origins; (B) MLST types; (C) Conjugation frequency ranges of these strains, and (D) Prevalence of *papC* genes.

Finally, in order to confirm the transfer of ESBL genes, different PCRs were performed for the detection of *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} genes in the transconjugants (Figure 4.5). As an example, Figure 4.5A shows the presence of TEM-1 gene in 4 transconjugants obtained from farm (F) and rivers (R) strain donors (1F, 2F, 3F, 1R). In a similar way, Figure 4.5B shows 5 transconjugants also from rivers (R) and WWTPs (W) (2R, 1W, 2W), that had acquired the type of CTX-M present in the donor strain (CTX-M1 or CTX-M9).

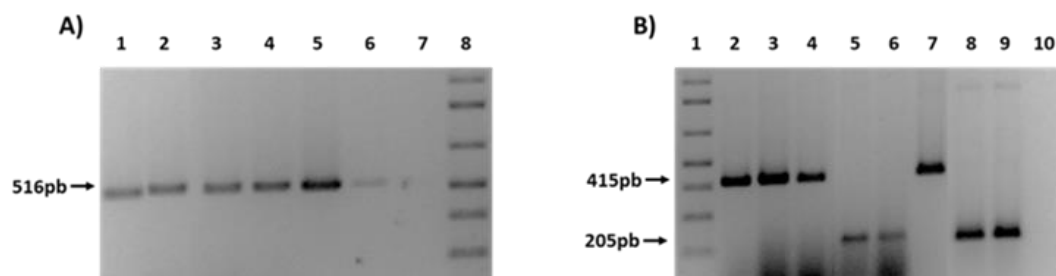


Figure 4.5. PCRs for the ESBL genes detection in transconjugants. (A) Presence of TEM-1 gene. 1: 1F; 2: 2F; 3: 3F; 4: 1R. 5-6: C + TEM-1; 7: C-; 8: 1Kb plus ladder. (B) Presence of CTX-M 1 and CTX-M9. 1: Kb plus ladder; 2: 1F; 3: 2F; 4: 2R; 5: 1W; 6: 2W. 7: C + CTX-M1; 8-9: C + CTX-M9; 10: C-.

To sum up all the findings, Figure 4.6 shows the phenotypic and genotypic characteristics of the 70 isolates tested in the conjugation assays. Red colored boxes indicate the riskiest combination, according to the ranking presented in the figure legend. Although the highest conjugation frequency average has been observed in strains isolated from aquatic environments ($1.15 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$), these strains only have one or two virulence factors. In contrast, clinical isolates contain the greatest amount of virulence factors studied and are related with the most pathogenic phylogroups. It must be taken into account that five strains isolated from clinical samples and healthy volunteers have been characterized as potentially pathogenic since all of them belong to the ST131-B2 phylogroup (Merino et al., 2016), contain between 3 and 5 virulence factors and most of them have high conjugation rates.

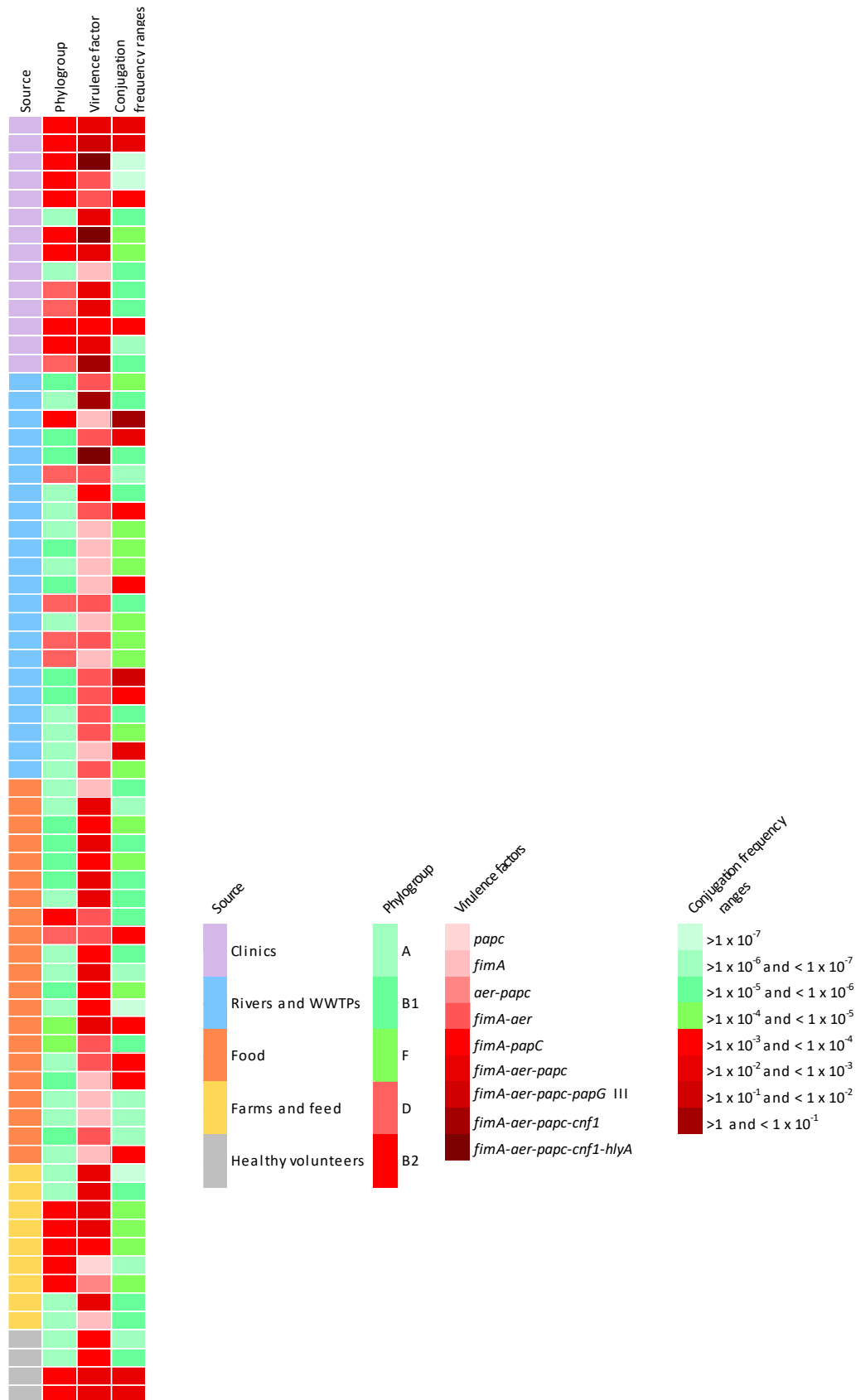


Figure 4.6. Phenotypic and genotypic characteristics of the 70 isolates tested in the conjugation assays. Red coloured boxes indicate the riskiest combination, according to the ranking presented in the figure legend.

4. Discussion

This study aimed to characterize the virulence and conjugative capacity of ESBL-producing *E. coli* isolates from human, food products, farm origin, and water environments, for a better understanding of the risk of dissemination of these resistant bacteria.

As expected, clinical isolates showed the highest prevalence of the studied virulence factor genes (encoding adhesins, siderophores, and toxins), in accordance with the main observed phylogroups in this origin (B1, B2 and D), which have been associated with more virulent strains (Figure 4.6). However, it must be noticed the presence of several VFs in strains isolated from aquatic environments, which could have been acquired by conjugation thanks to the high HGT frequencies observed in those strains. Furthermore, it is remarkable that the majority of human strains showing the ST131 carried 3 or more VF genes. Our results contrast with those of Alonso et al. (2017) who reported the apparent absence of classical VF, such as *papC*, *cnf1* and *hlyA*, in members of the ST131 group. In addition, the only strain of the present study in which the co-occurrence of 5 VF genes was observed (*fimA*, *aer*, *papC*, *cnf1* and *hlyA*) was a clinical isolate ST131. Thus, the pathogenicity of ST131 *E. coli* isolates (causing infections in both community and hospital) has been associated to the large number of virulence-associated genes they contain (Nicolas-Chanoine et al., 2014).

Regarding adhesins, fimbriae have a fundamental role in the colonization (type I) and pathogenicity (type P) of extraintestinal infections caused by *E. coli* (such as urinary infections). Concerning *fimA*, the high prevalence observed (97.3%) suggests that type I fimbriae are widely distributed. Despite the fact that their presence is not limited to pathogenic strains (Alonso et al., 2017), the expression of these fimbriae improves the virulence of uropathogenic *E. coli* (Connell et al., 1996). Similarly, P

fimbriae contribute to the virulence of uropathogenic strains by promoting bacterial colonization of target tissues and stimulating a host inflammatory response (Tiba et al., 2008; Waksman and Hultgren, 2009). In the present study, we examined the genes associated with the outer membrane protein (*papC*) and *papG* III allele adhesin. The first one has been detected in all the studied environments, with a lower prevalence in aquatic environments (rivers and WWTPs, 15.2%). In contrast, *papG* III genes have been detected mainly in clinical strains, in accordance with the reported presence of this virulence factor in *E. coli* strains causing pyelonephritis or cystitis (Wullt et al., 2000; Féria et al., 2001). These genes have also been detected in two strains isolated from chicken and beef belonging to phylogroup D and carrying *intI1* and *bla_{CTX-M14}*. These results support the potential transmission of pathogenic *E. coli* through foods, taking into account that an effective cell adhesion followed by invasion are the earliest events mediating host-pathogen interaction (Hussain et al., 2019). In summary, type 1 fimbriae and P fimbriae can co-exist in the same microorganism, since the 6 positive strains for *papG* III also contain *fimA*. The reported association between *papG* III gene and genes encoding α -hemolysin (*hlyA*) and the cytotoxic necrotizing factor (*cnf1*) (Tiba et al., 2008) has not been confirmed in this study.

With respect to siderophores, the *aer* gene has been detected in all environments but with higher prevalence in clinical isolates (91.6%). This gene encodes a bacterial iron chelating agent that allows *E. coli* to obtain iron from iron-poor environments such as the urinary tract (Vagralli, 2009). The observed prevalence (72%) is similar to that reported by Raeispour and Ranjbar (2018), but higher than that observed by Jalali et al. (2015). Some works indicate that there is a large variation in the *aer* frequencies, because the prevalence of this gene vary with phylogenetic groups, localization and clinical conditions (Abe et al., 2008). Furthermore, Arisoy et al. (2006) pointed out that

aer might be one of the main contributors to the persistence of *E. coli* in the intestinal flora and Searle et al. (2015) indicated that environmental *E. coli* isolates contain less genes associated with aerobactin. On the other hand, the clonal complexes ST155 linked with the phylogroup B1 are frequently associated with resistance and even with the ESBL phenotype in *E. coli* from human, animal and environmental sources. So, based on our results and consistent with those of Alonso et al. (2017), the virulence-associated factors genes of this ST were mainly *fimA* and *aer*.

Genes *hlyA* and *cnf1* encode toxins that can participate in the disruption of the epithelial barrier, allowing bacteria to pass from the digestive tract into the bloodstream and colonize different tissues, such as the urinary tract (Chen et al., 2003). Hence, these factors are related to extraintestinal infections, mainly with uropathogenic strains and enterohemorrhagic *E. coli* that can cause diarrheal and haemolytic uremic syndrome (Bielaszewska et al., 2014). In accordance with these observations, 5 clinical isolates from urine samples contain the *cnf1* gene. In addition, in 3 of them *hlyA* and *cnf1* genes coexist, in support of the observations of Ruiz et al. (2002) who reported co-localization of both genes in the same pathogenicity island. In contrast to the reported by Johnson et al. (2001), the observed prevalence of *cnf1* in the present study is higher than that of *hlyA* (5.3% and 2%, respectively). Other authors reported that these VF are very prevalent in clinical strains of *E. coli* (Cortés et al., 2010). However, these two factors have also been detected in 3 isolates from wastewater treatment plants (WWTPs). The latter observation would pose an especial risk, since these sources are considered to be the hotspots for the environmental dissemination of antibiotic resistant bacteria (ARB) (Von Wintersdorff et al., 2016). Since cell adhesion, invasion, and the presence of toxins are the key events in pathogenicity, we can point out that the strains with the highest pathogenic potential are the 3 positives for *hlyA* gene, which were isolated from

clinical samples and WWTP (Figure 4.6). However, it would be interesting to study whether these genetic profiles correspond to virulent phenotypes by performing biofilm formation, adhesion and invasion assays.

Although WWTPs are designed to reduce the contamination and organic matter of water, the presence of resistant bacteria in the effluents has been reported (Ojer-Usoz et al., 2014; Müller et al., 2016). In fact, the environmental conditions prevalent in these plants favor the proliferation of ARB, the dispersion of ARG and the production of strong biofilm that increases the capacity of bacteria to colonize the sewer system (Calhau et al., 2015; Müller et al., 2018). High conjugation rates have been reported in bacterial biofilms (Hausner and Wuertz, 1999), which together with the observed conjugation frequencies in aquatic strains, points at WWTPs as dangerous environments for the transmission of AMR. As indicated by WHO (2016), the appropriate management and treatment of sewage is an essential action for the prevention of the spread of different human diseases. Therefore, the first step to combat environmental dissemination routes of AMR is to ensure that at least basic sanitation needs are met.

However, there is no consensus in the scientific community on what levels of ARB and ARG are safe for the environment. Assessing the different risks to which human populations may be exposed and determining pollutants concentrations should be one of the main objectives (Bürgmann et al., 2018). Nonetheless, it is difficult to imagine a risk assessment framework that includes all complex gene transfer events, which may take place from environmental bacteria to human or animal pathogens (Klümper et al., 2014).

Surveillance of ARB and ARG in humans and farm animals should be implemented to establish preventive measures based on the detection of the most appropriate genetic markers. For that, it would be valuable to determine whether simple

indicators may be used as predictors of broad antibiotic dissemination events. According to Gillings et al. (2015) the integrase class 1 *intI1* could be used as a promising indicator for anthropogenic ARG contamination, because this genetic element has a high clinical relevance. In fact, the 92% of the strains tested in this study carried the aforementioned gene *intI1* (Figures S6.1-S6.5). Another thing that would be valuable to measure is the rates at which the horizontal gene transfer occurs in the WWTPs. However, this is still an important knowledge gap (Bürgmann et al., 2018). In this respect, it has been reported that conjugation is an extremely effective mechanism for dissemination of ESBLs (Franciczek and Krzyzanowska, 2014). Our data reinforce the hypothesis of ARG dissemination in aquatic environments through this mechanism, because higher conjugation frequencies have been observed in strains isolated from these environments, especially from WWTPs. In addition, conjugation experiments showed that these genes are probably located in the same transferable plasmid. In fact, the 4 strains with higher conjugation frequencies, contain the integrase class 1 *intI1* gene and different insertion sequences (*ISEcp1*, IS26, IS903) (Figures S6.1-S6.5). Nevertheless, very little is known about the health risks posed by exposure to commensal or environmental bacteria that carry mobile ARGs (Klümper et al., 2014). The conjugation process may occur in many types of ecosystems, but in food environments can have very serious consequences, due to the mobilization of virulence genes and toxins (Rossi et al., 2014)]. As good news, our results indicate that the average conjugation frequencies in bacteria isolated from food products was not very high ($9.61 \times 10^{-4} \pm 1.96 \times 10^{-3}$). The food chain is one of the main routes for the introduction of resistant bacteria into the gastrointestinal tract, where genes can be transferred between pathogenic and opportunistic bacteria (as shown from our data from healthy volunteers).

In conclusion, this study has provided information on genotypes related to resistance, virulence and conjugation capacity of ESBL-producing *E. coli* isolated from different environments. The obtained results point out the important role of the aquatic environment for virulence gene exchange and resistance dissemination. Therefore, it would be necessary to control the presence of multidrug resistant bacteria (o superbug) in risky environments such as wastewater treatment plants (WWTPs) to ensure the effectiveness of antibiotics for public health.

Objetivo 3



PREVENCIÓN: Desarrollo de medidas alternativas al uso de antibióticos en producción animal

CONTEXTO

El empleo de antibióticos en producción animal con fines terapéuticos y profilácticos contribuye a la selección de bacterias resistentes que pueden transferirse de animales a humanos. Además, los antibióticos se han utilizado durante décadas como promotores de crecimiento animal (hecho que está prohibido desde 2006 en la Unión Europea), contribuyendo también al incremento y diseminación de estas resistencias.

Una de las líneas estratégicas del PRAN es impulsar medidas alternativas de prevención y tratamiento animal, que puedan sustituir o reducir en la medida de lo posible, el uso de antibióticos en producción animal. Así, disminuyendo la presión antibiótica en el entorno animal se podría reducir la presencia y dispersión de bacterias resistentes entre los distintos ecosistemas. En este contexto, uno de los objetivos del proyecto INTERREG POCTEFA EFA183/16/OUTBIOTICS es evaluar la posible inclusión de nanomateriales de plata en piensos como alternativa al empleo de antibióticos en producción animal. En el **Capítulo 5** se ha estudiado la actividad antimicrobiana de estos nanomateriales frente a una selección de bacterias resistentes a distintos grupos de antibióticos.

Capítulo 5



Estudio de la capacidad bactericida de nanomateriales con base plata para su posible inclusión como aditivo en piensos

Los resultados de este capítulo han sido obtenidos en el marco del proyecto “EFA183/16/OUTBIOTICS. Proyecto financiado por el Programa Europeo INTERREG V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020). “Tecnologías innovadoras para diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA”.

1. Introducción

El empleo de antibióticos en piensos de animales de consumo con fines profilácticos y terapéuticos implica el uso de concentraciones subterapéuticas, que asociado con tiempos de exposición prolongados, favorece la aparición y diseminación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos (Holmer et al., 2019). De esta manera, los animales actúan como reservorio de genes y de bacterias resistentes que posteriormente pueden transmitirse al ser humano a través de los alimentos (Brown et al., 2019; Roth et al., 2019). Así, Calbo et al. (2011) determinaron la implicación de una cepa de *K. pneumoniae* multirresistente (MDR) productora de BLEE en un brote nosocomial de transmisión alimentaria en España, demostrando que los alimentos pueden ser un vector de transmisión de BLEEs. Otros estudios mostraron que el porcentaje de cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas aisladas de pollos y cerdos en algunos países de la Unión Europea (España, Polonia, Reino Unido, Alemania y Francia) es alto, lo que sugiere que estos antibióticos se han estado utilizado ampliamente de manera profiláctica en estos países (Roth et al., 2019). De la misma manera, un brote de salmonelosis en los Estados Unidos (EEUU) se relacionó con pollos contaminados con una cepa de *Salmonella* MDR (Gieraltowski et al., 2016). En definitiva, la exposición a antibióticos en el entorno animal y humano conlleva a un incremento en la incidencia de bacterias resistentes (Yang et al., 2019; EFSA, 2020).

Por ello, la Unión Europea (UE) prohibió en 2006 el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en piensos (UE, 2006). Sin embargo, a pesar de estas prohibiciones y según la Agencia Europea del Medicamento (EMA), entre 2010 y 2015 España fue el segundo país de la UE donde más antibióticos se emplearon en la cría de ganado (402 mg/kg de carne producido) (EMA, 2017). Afortunadamente, tras la implantación del Plan Nacional de Resistencias a antibióticos (PRAN) en junio de 2014,

se registró una reducción del 32,4% en el consumo de antibióticos en sanidad animal en el periodo 2014-2017, en particular gracias a los programas REDUCE instaurados en los diferentes sectores ganaderos. Por ejemplo, esta iniciativa ha logrado disminuir el consumo de colistina en porcino un 97,2% y en avicultura se ha reducido un 71% el consumo total de antibióticos en los últimos años (AEMPS, 2019a).

Dado que el uso de aditivos zootécnicos en alimentación animal es una práctica habitual y debido a la prohibición del empleo de antibióticos como promotores de crecimiento, continúa la búsqueda de alternativas al uso de antibióticos. Entre las opciones actuales más utilizadas en producción avícola y porcina se incluye el uso de ácidos orgánicos, probióticos, prebióticos, aceites esenciales, extractos de plantas y metales como el cobre y el zinc (Griggs, 2005). Sin embargo, estos dos últimos presentan como desventaja una considerable retención tisular y ser potencialmente contaminantes (Zhang and Guo, 2007). Siguiendo esta línea de actuación se llegó a utilizar plata como aditivo en alimentación de pollos en los años 50, pero debido a su alto coste de fabricación se dejó de emplear (Fondevila, 2010). Actualmente, y gracias al desarrollo tecnológico de los procesos de fabricación industrial de nanopartículas, las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen un interés especial (Franci et al., 2015). De esta manera, Fondevila et al. (2009) observaron que las retenciones tisulares de plata en lechones eran 100 veces inferiores a las referidas por la inclusión de zinc. Al mismo tiempo, el potencial contaminante de la excreción de plata a través de los purines se considera bajo respecto al zinc y cobre. Por todo ello, esta tecnología hace que las AgNPs puedan ser consideradas como una posible alternativa en el uso de aditivos antimicrobianos para la alimentación animal.

Durante siglos, la plata ha sido conocida por sus efectos antibacterianos y se ha utilizado para prevenir y controlar infecciones causadas por microorganismos debido a

su baja citotoxicidad (Taraszkievicz et al., 2013). El modo de acción de este metal aún no se ha dilucidado por completo y según diversos estudios, ejerce su actividad antimicrobiana a través de distintos mecanismos: interactúa físicamente con la superficie celular bacteriana alterando las funciones de las membranas celulares y provocando cambios estructurales que hace que las bacterias sean más permeables (Franci et al., 2015); reacciona con el ADN bacteriano inhibiendo la replicación celular y provocando la muerte bacteriana (Rai et al., 2014). Al mismo tiempo, el hecho de que la resistencia bacteriana a este elemento sea extremadamente rara (Silver, 2003), le confiere una especial ventaja para el desarrollo de alternativas antibacterianas que contengan este material (Marambio-Jones and Hoek, 2010). Por otro lado, las arcillas también se utilizan en la alimentación animal con fines nutricionales (aumento de la digestión de nutrientes, reducción de la velocidad del tránsito), sanitarios (prevención de diarreas) y ambientales (reducción de emisiones de amoníaco y malos olores) (Abad-Álvaro et al., 2019).

Uno de los objetivos del proyecto INTERREG POCTEFA EFA183/16/OUTBIOTICS (en el que se incluye este capítulo), es evaluar la eficacia y seguridad de compuestos basados en arcillas y que contengan nanopartículas de plata, como una posible alternativa para su uso como aditivos en la alimentación animal, garantizando la inocuidad en los animales y en el medio ambiente. Este planteamiento es acorde con el Reglamento (CE) N° 1831/2003 (UE, 2003) sobre los aditivos en la alimentación animal, donde se recoge “la necesidad de desarrollar productos alternativos que sustituyan el empleo de antibióticos”. De esta manera, el objetivo específico de este capítulo ha sido evaluar la actividad bactericida del material C3 desarrollado por Laboratorios ENOSAN S.L. (nanopartículas de plata depositadas sobre

un material base de caolinita) frente a una selección de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluidas bacterias resistentes a distintos grupos de antibióticos.

2. Material y métodos

2.1. Productos de ensayo

Los productos utilizados en los diferentes ensayos *in vitro* fueron suministrados por Laboratorios Enosan S.L. El tratamiento de preparación del nanomaterial con base plata (bajo patente), permite el depósito de plata en la superficie del caolín en forma de nanopartículas de plata metálica. Se analizaron 4 lotes del producto C3 (L1, L6, L7 y L8), que contenían aproximadamente un 1% de plata. El material inerte C2 (L2) fue utilizado como control (caolín sin plata, con tratamiento tecnológico similar a C3).

2.2. Caracterización físico-química

La caracterización físico-química de los distintos materiales caolín-plata fue llevada a cabo por el Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAs) de la Universidad de Zaragoza. Dado que no son resultados propios de esta investigación, se resumen a continuación las características más relevantes del nanomaterial C3.

El contenido de humedad promedio presente en el material C3 fue de 0,32% y el contenido promedio de plata total fue de $1,04 \pm 0,10\%$. El análisis mediante microscopía electrónica de barrido confirmó la presencia de nanopartículas de plata (diámetro medio de 27 nm) en la superficie de las láminas de caolinita del material C3, tal como se muestra en la Figura 5.1B. El apartado A de dicha Figura muestra la imagen del caolín tratado sin plata (C2).

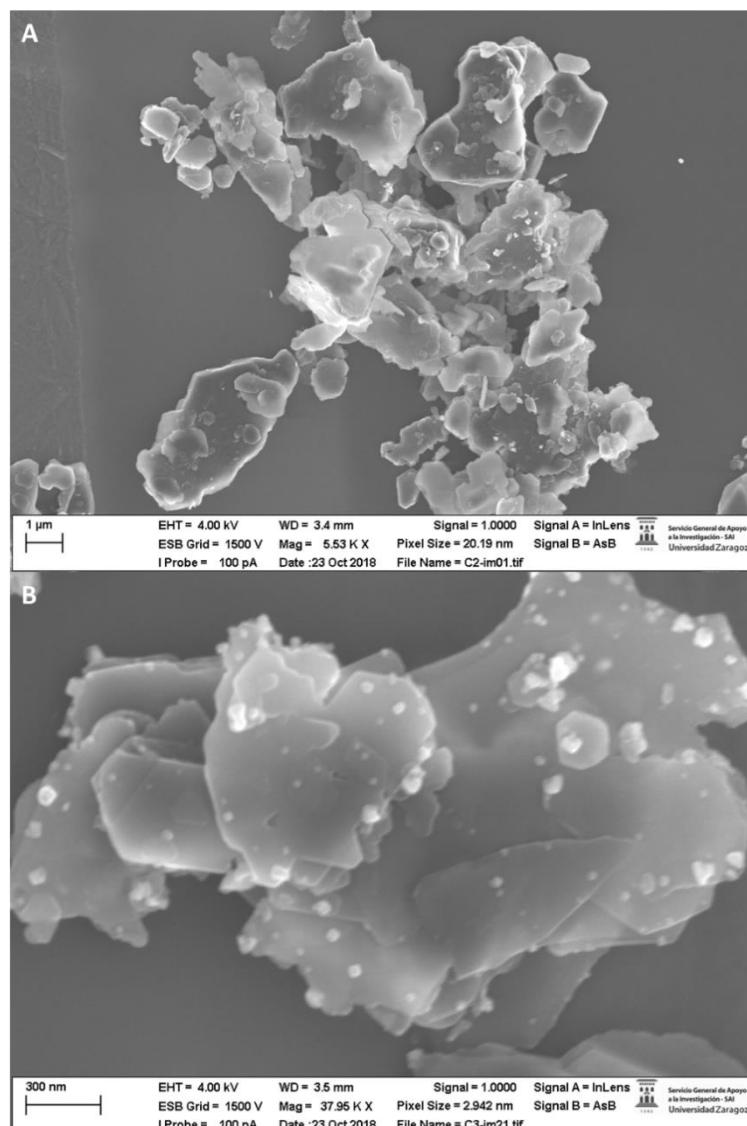


Figura 5.1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (FESEM). **A)** Caolín tratado sin plata (C2), **B)** material C3-L1. Nanopartículas de plata visibles en B en color blanco. Realizado por el grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAs) de la Universidad de Zaragoza.

2.3. Preparación de las suspensiones de productos de ensayo

Para testar la actividad bactericida de los distintos productos de ensayo descritos anteriormente, se prepararon suspensiones de 50 mg/ml o 100 mg/ml en agua desionizada tipo II (Wasserlab, Millipore). Las suspensiones se prepararon el mismo día de la realización del ensayo y se mantuvieron a temperatura ambiente.

2.4. Antibiogramas

Esta parte del estudio se llevó a cabo con las bacterias Gram negativas y Gram positivas que se muestran en la Tabla 5.1. Se incluyen cepas de referencia (CECT) con

fenotipos sensibles a antibióticos (con la excepción de *Klebsiella pneumoniae* CECT 7787), entre las que se encuentran especies clasificadas como especialmente resistentes a los antibióticos (ESKAPE; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*). Además, se incluyen dos especies de *Salmonella*, dada su relación con infecciones transmitidas en el entorno animal. Por otro lado, se han seleccionado bacterias que presentan diversos tipos de resistencias antimicrobianas y que han sido aisladas de distintos entornos acuáticos y de granjas (Pérez-Etayo et al., 2020).

Tabla 5.1. Cepas utilizadas en los antibiogramas y características de las mismas

Identificación	Origen	Resistencias	Gen resistencia
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	CECT (410)	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CECT (435)	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	CECT (7787)	Penicilinas	<i>bla</i> _{SHV-18}
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	CECT (9111)	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CECT (108)	-	-
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	CECT (194)	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CECT (434)	-	-
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	CECT (4300)	-	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	CECT (4594)	-	-
<i>E. coli</i> BLEE 1	Río Clamor	Penicilinas/cefalosporinas	<i>bla</i> _{CTX-M14} , <i>bla</i> _{TEML-278}
<i>E. coli</i> BLEE 2	Río Gállego	Penicilinas/cefalosporinas	<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{TEML-278}
<i>E. coli</i> BLEE 3	Granja cerdos	Penicilinas/cefalosporinas	ND
<i>S. fonticola</i> BLEE	Río Gállego	Penicilinas/cefalosporinas	<i>bla</i> _{CTX-M1}
<i>K. pneumoniae</i> BLEE	Depuradora Bera	Penicilinas/cefalosporinas	<i>bla</i> _{CTX-M14}
<i>E. coli</i> CARBA	Depuradora Tudela	Penicilinas/cefalosporinas/carbapenems	<i>bla</i> _{TEML-278} , KPC
<i>C. freundii</i> CARBA	Depuradora Tudela	Penicilinas/cefalosporinas/carbapenems	<i>bla</i> _{TEML-278} , KPC
<i>P. aeruginosa</i> CARBA 1	Depuradora Tudela	Penicilinas/cefalosporinas/carbapenems	<i>bla</i> _{TEML-278}
<i>P. aeruginosa</i> CARBA 2	Depuradora Estella	Penicilinas/cefalosporinas/carbapenems	ND
<i>E. coli</i> COL	Colector conejos Murchante	Colistina	<i>mcr-1</i>
<i>K. oxytoca</i> COL	Río Segre	Colistina	ND
<i>S. aureus</i> SARM 1	Río Cinca	Meticilina	ND
<i>S. aureus</i> SARM 3	Clínica	Meticilina	<i>mecA</i>
<i>E. faecium</i> VANCO 2	Colector conejos Murchante	Vancomicina	<i>vanB</i>

ND: no detectado

A partir del conjunto de cepas mantenido en congelación (-135°C) se prepararon las cepas de trabajo mediante siembra en medios generales (TSA; Scharlau, Sentmenat, Barcelona) e incubación a 37°C durante 24 h. Las cepas se mantuvieron en refrigeración (5°C ± 3°C), realizando pases periódicos a medios frescos para los diferentes ensayos (incubación a 37°C durante 24 h). A partir de estos cultivos frescos, se prepararon inóculos en caldo peptona (APT; Scharlau) ajustando la concentración en densitómetro (DEN-1-BIOSAN) equivalente a 0,5 McFarland (aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/ml). Tras extender el inóculo con un hisopo en todas las direcciones de la superficie de una placa de Mueller Hinton II con cationes ajustados (MH, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia), se practicaron pocillos en las placas y se colocaron 50 µl de la suspensión del producto a ensayar (50 mg/ml). Como controles positivos de inhibición se utilizaron discos de antibióticos: Ampicilina 10 µg (AMP), Amoxicilina/Clavulánico 30 µg (AMC) y Gentamicina 10 µg (GM), suministrados por Becton Dickinson. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y posteriormente se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición generados.

2.5. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida (CMI, CMB)

Se llevó a cabo la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del producto C3-L1 frente a cepas de colección (*E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecium* ATCC 19434, *S. enteritidis* ATCC 13076 y *S. typhimurium* ATCC 14028) y frente a 9 cepas resistentes a antibióticos (*E. coli* BLEE 1, 2, 3, *E. coli* CARBA, *C. freundii* CARBA, *P. aeruginosa* CARBA 2, *E. coli* COL, *S. aureus* SARM3 y *E. faecium* VANCO 2). La CMI es la mínima concentración del agente capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo. La CMB es la concentración mínima del agente que

destruye el 99,9% de la población microbiana inicial, por lo que se requiere realizar el recuento de la población que sobrevive y compararlo con la concentración inicial de microorganismos.

Dada la turbidez aportada por el propio producto en suspensión, se empleó la técnica de microdilución en placa de microtiter mediante el ensayo de viabilidad celular con resazurina para calcular la CMI, por el cambio de color que se produce cuando hay crecimiento de microorganismos (forma reducida). Posteriormente, se sembró en agar TSA para calcular la CMB mediante el recuento de células viables. El procedimiento fue el siguiente:

- **Inóculos:** se preparó un cultivo fresco de las cepas a ensayar en agar TSA (24 h, 37°C). Tras ajustar el inóculo a 0,5 en la escala de McFarland se realizó una dilución 1/100 del inóculo en caldo MH (aprox. $1,5 \times 10^6$ UFC/ml). Para conocer la concentración inicial de cada microorganismo se realizaron diluciones seriadas y siembra en agar TSA.
- **Productos:** se prepararon suspensiones del producto a 50 mg/ml o 100 mg/ml, para bacterias Gram negativas o Gram positivas, respectivamente (concentración de plata equivalente a 500 $\mu\text{g/ml}$ o 1000 $\mu\text{g/ml}$). La resazurina (Acros organics, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) se preparó al 0,02%, disolviendo 0,002 g en 10 ml de H₂O desionizada tipo II, homogeneizando con agitador y esterilizando a través de un filtro de 0,22 μm (Millipore Millex PES).
- **Placa de 96 pocillos:** a cada pocillo se añadieron 100 μl de caldo MH estéril. Tras añadir 100 μl de la suspensión de producto C3 al primer pocillo se practicaron 8 diluciones dobles. A continuación, se añadieron 30 μl de la solución de resazurina a cada pocillo y 100 μl del inóculo preparado (concentración inicial en cada pocillo en torno a $1,5 \times 10^5$ UFC/ml). Cada una de las concentraciones se testó por

triplicado. Las dos últimas columnas correspondieron a los controles negativo (200 μ l de caldo MH+ 30 μ l resazurina) y positivo (100 μ l caldo MH + 100 μ l inóculo + 30 μ l resazurina).

- **Determinación de CMI:** las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. La CMI correspondió a la concentración del último pocillo en el que no se produjo cambio de color (si hay crecimiento bacteriano el pocillo vira del color azul natural de la resazurina a su forma reducida, que es de color rosa).
- **Determinación de CMB:** a partir del pocillo determinado como CMI y concentraciones superiores se sembraron 0,1 ml en agar TSA. Tras la incubación a 37°C durante 24 h se contaron las UFC y se determinó la CMB teniendo en cuenta el recuento inicial de cada microorganismo (destrucción del 99,9% de la población).

2.6. Curvas de inhibición en medio líquido

Se estudió la actividad antimicrobiana del nanomaterial C3-L1 en función del tiempo frente a 7 cepas (*E. coli* ATCC 8739, *E. coli* BLEE 2, *E. coli* BLEE 3, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 6538 y *S. aureus* SARM 3), para lo que se realizaron curvas de inhibición en medio líquido (caldo MH) empleando distintas concentraciones (CMB, CMI y concentraciones subinhibitorias). Se partió de una concentración conocida de cada cepa (inóculos 0,5 McFarland) y se puso en contacto con distintas concentraciones del producto (realizando diluciones dobles seriadas) en tubos de ensayo estériles. Estos tubos contenían 4 ml de caldo MH estéril, 1 ml de la solución del producto C3-L1 y 50 μ l de inóculo bacteriano. Además, se prepararon 2 tubos que contenían las mismas cantidades de MH e inóculo, pero en lugar de producto C3-L1 se añadió 1 ml de solución C2-L2 (control negativo de inhibición) y 1 ml de agua desionizada (control positivo de

crecimiento). Inmediatamente después de la inoculación de los distintos tubos, se realizó el recuento de microorganismos para conocer la concentración inicial de partida (UFC/ml). A continuación, se llevaron a incubar a 37°C en agitación y se tomaron muestras a diferentes tiempos (1, 2, 4, 8 y 24 h). Se realizaron diluciones seriadas y se sembró 0,1 ml de cada dilución en agar TSA, para conocer el número de microorganismos viables. Posteriormente, se calculó el \log_{10} UFC/ml y se representaron de manera gráfica las distintas curvas de inhibición.

3. Resultados

3.1. Antibiogramas

Los resultados obtenidos con los distintos lotes del producto C3 frente a las 23 cepas testadas se muestran en la Tabla 5.2. El nanomaterial C3 presentó actividad antimicrobiana frente a todas ellas, incluidas las cepas ESKAPE y las resistentes, observándose halos de inhibición con unos diámetros que oscilaron entre 11-21 mm. El producto sin plata C2 no mostró actividad.

Tabla 5.2. Halos de inhibición de los productos C2 (sin plata), C3 (con plata) y antibióticos control (diámetro en mm).

Cepa	C2	C3				Antibióticos control ²
	L2 ¹	L6	L7	L8	X ± sd	
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	6	19	20	21	20 ± 1	AMC 37
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6	20	20	20	20 ± 0	GM 24
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	6	15	15	15	15 ± 0	AMC 19
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	6	19	20	20	19,67 ± 0,58	GM 17
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6	17	18	17	17,33 ± 0,58	GM 17
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	6	12	11	12	11,67 ± 0,58	GM 20
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6	17	16	16	16,33 ± 0,58	AMP 20
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	6	15	15	15	15 ± 0	AMP 27
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	6	15	16	15	15,33 ± 0,58	AMP 26
<i>E. coli</i> BLEE 1	6	15	15	14	14,67 ± 0,58	AMC 22
<i>E. coli</i> BLEE 2	6	16	16	16	16 ± 0	AMC 19
<i>E. coli</i> BLEE 3	6	18	18	18	18 ± 0	AMC 20
<i>S. fonticola</i> BLEE	6	15	16	16	15,67 ± 0,58	AMC 19
<i>K. pneumoniae</i> BLEE	6	14	14	15	14,33 ± 0,58	AMC 19
<i>E. coli</i> CARBA	6	15	15	15	15 ± 0	GM 21
<i>C. freundii</i> CARBA	6	17	17	17	17 ± 0	GM 14
<i>P. aeruginosa</i> CARBA 1	6	21	21	21	21 ± 0	GM 21
<i>P. aeruginosa</i> CARBA 2	6	20	20	21	20,33 ± 0,58	GM 19
<i>E. coli</i> COL	6	16	16	16	16 ± 0	AMC 22
<i>K. oxytoca</i> COL	6	17	18	17	17,33 ± 0,58	AMC 30
<i>S. aureus</i> SARM 1	6	20	20	19	19,67 ± 0,58	AMC 25
<i>S. aureus</i> SARM 3	6	18	19	18	18,33 ± 0,58	GM 25
<i>E. faecium</i> VANCO 2	6	20	20	21	20,33 ± 0,58	AMC 40

¹Valor 6 significa ausencia de halo (6 mm es el diámetro del pocillo)

²AMP, Ampicilina; GM, Gentamicina; AMC, Amoxicilina/Clavulánico.

La Figura 5.2. ilustra a modo de ejemplo algunos antibiogramas obtenidos frente a cepas Gram negativas sensibles (A y B) y frente a cepas Gram negativas resistentes a antibióticos (C y D).

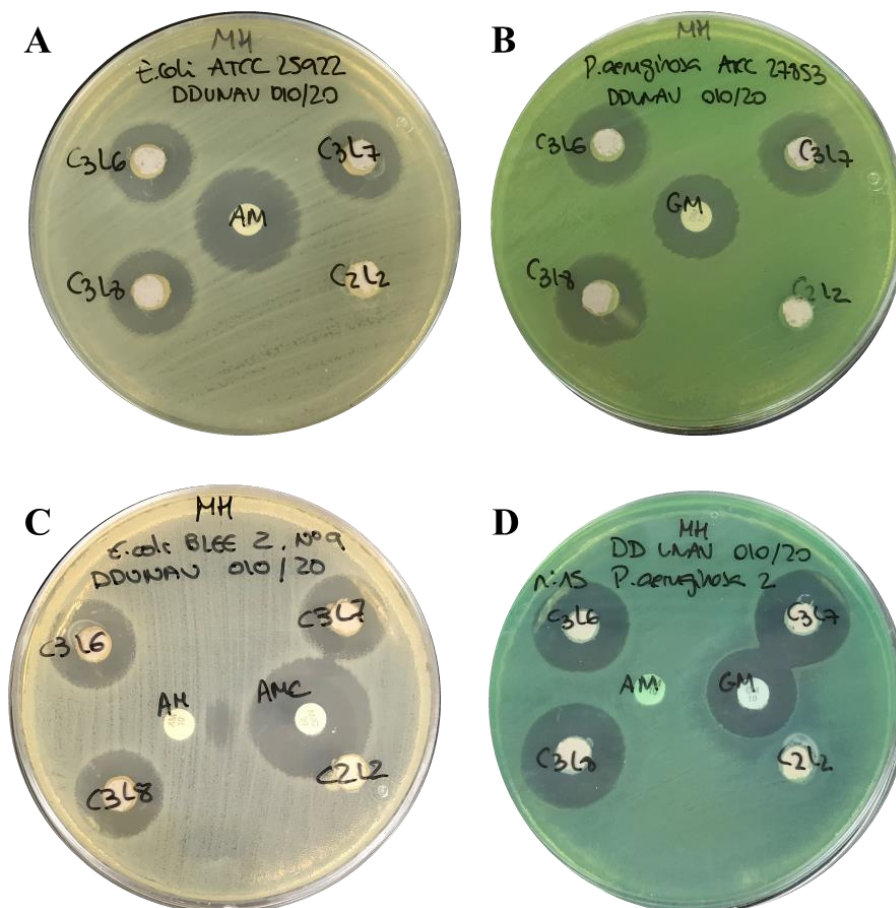


Figura 5.2. Antibiogramas de los distintos lotes de C3 (con plata) y C2 (sin plata) frente a *E. coli* ATCC 25922 (A), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (B), *E. coli* BLEE 2 (C) y *P. aeruginosa* CARBA 2 (D). Productos en solución 50 mg/ml. GM, gentamicina; AM ampilina; AMC ácido clavulánico.

En cuanto a las cepas Gram positivas testadas, la Figura 5.3. ilustra algunos antibiogramas obtenidos frente a cepas sensibles (A y B) y frente a cepas resistentes (C y D).

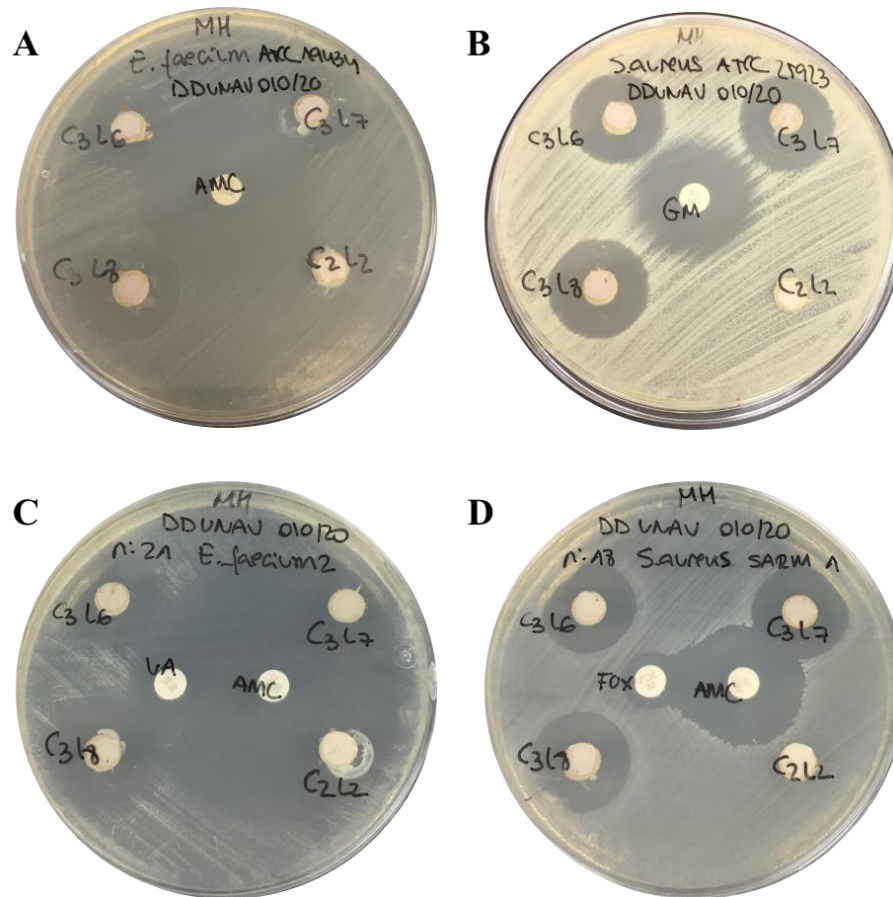


Figura 5.3. Antibiogramas de los distintos lotes de C3 (con plata) y C2 (sin plata) frente a *E. faecium* ATCC 19434 (A), *S. aureus* ATCC 25923 (B), *E. faecium* VANCO 2 (C) y *S. aureus* SARM 1 (D). Productos en solución 50 mg/ml. GM, gentamicina; AM ampilina; AMC ácido clavulánico; VA, vancomicina y FOX, cefoxitina.

3.2. Determinación CMI y CMB

La Tabla 5.3 resume los resultados obtenidos con las 15 cepas seleccionadas para este estudio (CECT y representativas de cada tipo de resistencia). Los valores de CMI y CMB se corresponden con $\mu\text{g/ml}$ de plata teóricos que habría por pocillo (teniendo en cuenta la cantidad de plata presente en el nanomaterial).

Tabla 5.3. Valores de CMI y CMB ($\mu\text{g/ml}$ plata) para el producto C3-L1 frente a diversas cepas

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)
<i>E. coli</i> ATCC 8739	7,8	15,6
<i>P. aeruginosa</i> ATTC 9027	3,9	7,8
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	15,6	31,3
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	7,8	250
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	7,8	15,6
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	7,8	15,6
<i>E. coli</i> BLEE 1	7,8	15,6
<i>E. coli</i> BLEE 2	7,8	15,6
<i>E. coli</i> BLEE 3	7,8	15,6
<i>E. coli</i> CARBA	7,8	15,6
<i>C. freundii</i> CARBA	7,8	15,6
<i>P. aeruginosa</i> CARBA 2	3,9	7,8
<i>E. coli</i> COL	7,8	15,6
<i>S. aureus</i> SARM 3	15,6	125
<i>E. faecium</i> VANCO 2	7,8	250

Como se puede observar, el producto C3 tiene mayor actividad frente a bacterias Gram negativas que frente a Gram positivas y no se han observado diferencias entre cepas sensibles y resistentes a antibióticos, a excepción de *S. aureus* SARM 3. Así, las CMB frente a bacterias Gram negativas oscilaron entre 7,8 $\mu\text{g/ml}$ (*P. aeruginosa*) y 15,6 $\mu\text{g/ml}$ (*E. coli* y *Salmonella*). Sin embargo, fue necesario elevar la concentración hasta 31,3 $\mu\text{g/ml}$ o 250 $\mu\text{g/ml}$ para obtener la CMB en el caso de bacterias Gram positivas como *S. aureus* ATCC 6538 y *E. faecium* ATCC 19434, respectivamente. Por otro lado, aunque la CMI de *E. faecium* fue de 7,8 $\mu\text{g/ml}$, la reducción de la viabilidad celular en un 99,9% no se produjo hasta la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$.

A modo de ejemplo, las Figuras 5.4 y 5.5 ilustran el aspecto de las placas de 96 pocillos tras la incubación a 37°C durante 24 h. Se observa el color azul de la resazurina en su forma natural y el color rosa en su forma reducida (que se produce si hay crecimiento de los microorganismos).

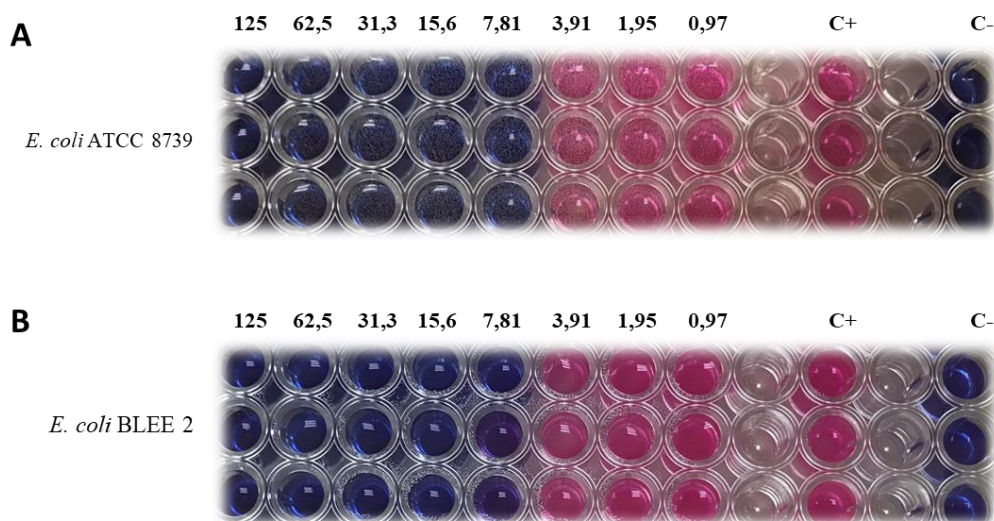


Figura 5.4. Determinación de CMI para el producto C3-L1 frente a bacterias Gram negativas: **A)** *E. coli* ATCC 8739 y **B)** *E. coli* BLEE 1. C-: control negativo (medio MH estéril). C+: control positivo de crecimiento (medio MH + inóculo).

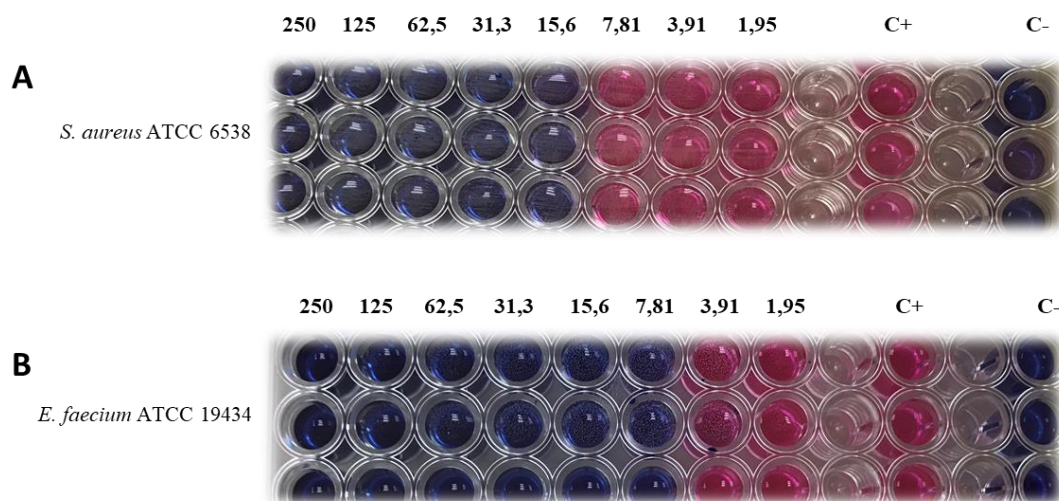


Figura 5.5. Determinación de CMI para el producto C3-L1 frente a Gram positivos: **A)** *S. aureus* ATCC 6538 y **B)** *E. faecium* ATCC 19434. C-: control negativo (medio MH estéril). C+: control positivo de crecimiento (medio MH + inóculo).

3.3. Ensayos en suspensión: curvas de inhibición

Las curvas de inhibición obtenidas frente a las 7 cepas seleccionadas se muestran en las Figuras 5.6, 5.7 y 5.8. En los ensayos con *E. coli* ATCC 8739 y *S. aureus* ATCC 6538 se incluyó también como control el producto C2-L2 (50 y 100 mg/ml, respectivamente), y tal como se observa en las Figuras 5.6A y 5.8A, se confirma

la ausencia de actividad antimicrobiana del material soporte caolín sin plata, ya que las curvas son exactas a las obtenidas con el control positivo de crecimiento.

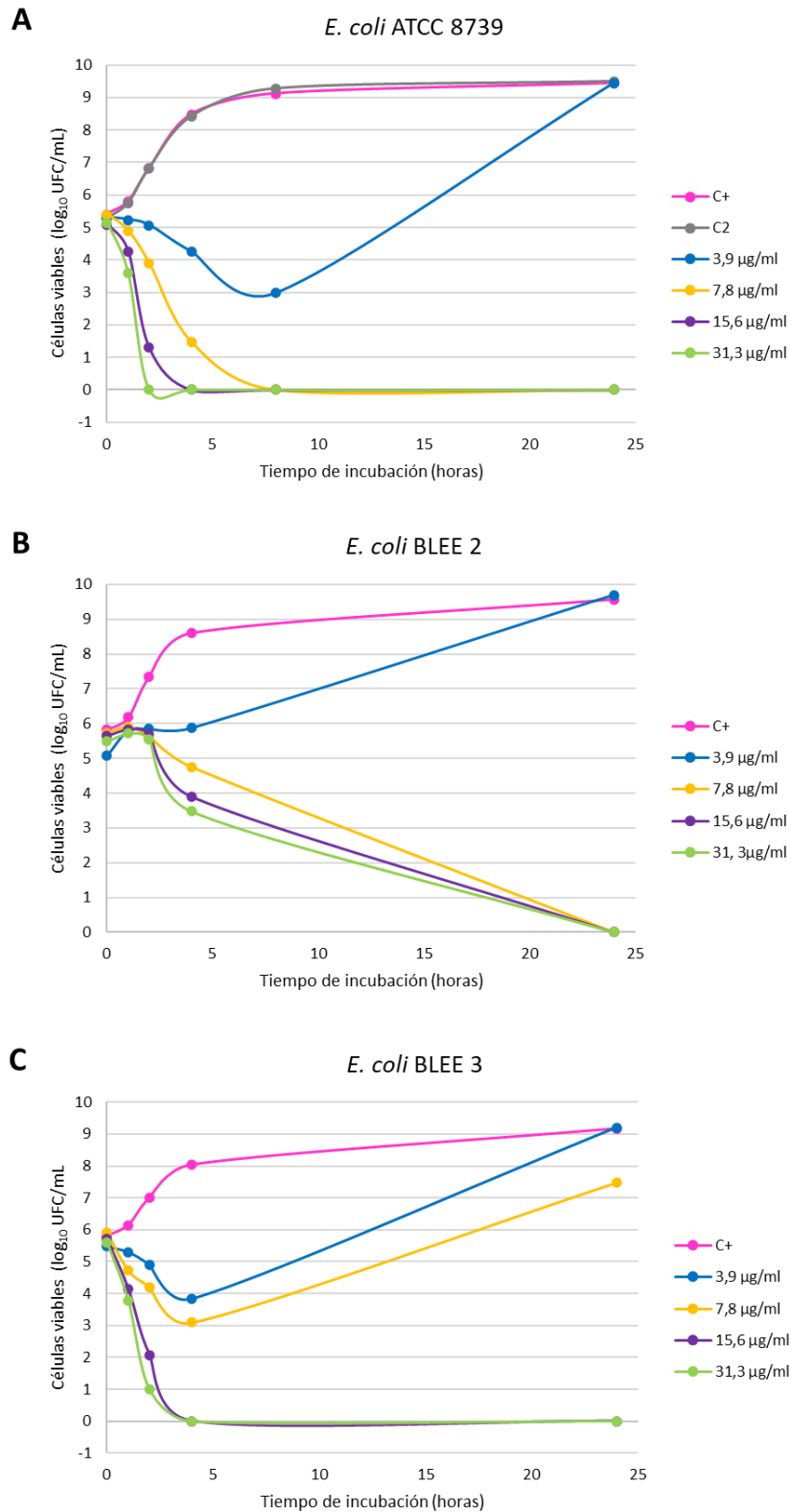


Figura 5.6. Curvas de inhibición del producto C3 en medio líquido frente a **A)** *E. coli* ATCC 8739, **B)** *E. coli* BLEE 2 y **C)** *E. coli* BLEE 3.

Las Tablas 5.4, 5.5 y 5.6 muestran los resultados de células viables (UFC/ml) obtenidos en los diferentes tiempos y concentraciones ensayadas.

Tabla 5.4. Células viables de *E. coli* ATCC 8739 (UFC/ml) tras la exposición a distintas concentraciones del producto C3-L1

Tiempo (h)	Sin producto Control +	Producto C2	Producto C3			
			3,9 µg/ml	7,8 µg/ml	15,6 µg/ml	31,3 µg/ml
0	2,6 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵
1	6,5 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	8,0 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁴	4,0 x 10 ³
2	7,0 x 10 ⁶	7,2 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁵	8,0 x 10 ³	2,0 x 10 ¹	<1
4	3,2 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁴	3,0 x 10 ¹	<1	<1
8	1,4 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁹	9,5 x 10 ⁹	<1	<1	<1
24	2,9 x 10 ⁹	3,3 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁷	<1	<1	<1

Sombreado: concentraciones que producen una reducción ≥ 3 log

Tabla 5.5. Células viables de *E. coli* BLEE 2 (UFC/ml) tras la exposición a distintas concentraciones del producto C3-L1

Tiempo (h)	Sin producto Control +	Producto C3			
		3,9 µg/ml	7,8 µg/ml	15,6 µg/ml	31,3 µg/ml
0	6,6 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵	5,4 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁵
1	1,5 x 10 ⁶	6,4 x 10 ⁵	7,8 x 10 ⁵	6,7 x 10 ⁵	5,2 x 10 ⁵
2	2,2 x 10 ⁷	7,1 x 10 ⁵	4,2 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁵
4	4,0 x 10 ⁸	7,6 x 10 ⁴	5,6 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³	3,0 x 10 ³
24	3,7 x 10 ⁹	5,0 x 10 ⁹	<1	<1	<1

Sombreado: concentraciones que producen una reducción ≥ 3 log

Tabla 5.6 Células viables de *E. coli* BLEE 3 (UFC/ml) tras la exposición a distintas concentraciones del producto C3-L1

Tiempo (h)	Sin producto Control +	Producto C3			
		3,9 µg/ml	7,8 µg/ml	15,6 µg/ml	31,3 µg/ml
0	6,3 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁵	8,4 x 10 ⁵	5,2 x 10 ⁵	4,1 x 10 ⁵
1	1,4 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁵	5,4 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	6,0 x 10 ³
2	1,0 x 10 ⁷	8,0 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	1,2 x 10 ²	1,0 x 10 ¹
4	1,1 x 10 ⁸	7,0 x 10 ³	1,2 x 10 ³	<1	<1
24	1,5 x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁷	<1	<1

Sombreado: concentraciones que producen una reducción ≥ 3 log

Se observa que la actividad bactericida es más rápida y con menos concentración de plata en el caso de *E. coli* ATCC 8739 (reducción del 100% de los microorganismos iniciales en 8 h con 7,8 µg/ml). Además, las concentraciones 15,6 µg/ml y 31,3 µg/ml produjeron una reducción de más de 3 log₁₀ UFC/ml en el recuento bacteriano después

de 4 h de incubación y este efecto letal persistió durante las 24 h de duración del experimento. Este efecto también se observó con la cepa *E. coli* BLEE 3 (aislada de una granja), a diferencia de lo ocurrido con la cepa *E. coli* BLEE 2, en la que fueron necesarias 24 h de incubación para obtener una reducción similar con ambas concentraciones.

Las dos cepas de *Salmonella* testadas presentan un comportamiento similar, como se puede observar en la Figura 5.7. A las 2 h de incubación se observa el efecto bactericida con la concentración de 15,6 µg/ml y superior (31,3 µg/ml). Las Tablas 5.8 y 5.9 muestran los resultados de células viables (UFC/ml) obtenidos en los diferentes tiempos y concentraciones ensayadas.

Tabla 5.8. Células viables de *S. typhimurium* ATCC 14028 (UFC/ml) tras la exposición a distintas concentraciones del producto C3-L1

Tiempo (h)	Sin producto Control +	Producto C3			
		3,9 µg/ml	7,8 µg/ml	15,6 µg/ml	31,3 µg/ml
0	5,7 x 10 ⁵	6,3 x 10 ⁵	7,1 x 10 ⁵	8,5 x 10 ⁵	7,7 x 10 ⁵
1	4,0 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	2,0 x 10 ³	2,0 x 10 ¹
2	9,3 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁴	1,8 x 10 ²	<1	<1
4	1,2 x 10 ⁸	3,0 x 10 ³	2,0 x 10 ¹	<1	<1
24	3,3 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁹	1,0 x 10 ⁵	<1	<1

Sombreado: concentraciones que producen una reducción ≥3 log

Tabla 5.9. Células viables de *S. enteritidis* ATCC 13076 (UFC/ml) tras la exposición a distintas concentraciones del producto C3-L1

Tiempo (h)	Sin producto Control +	Producto C3			
		3,9 µg/ml	7,8 µg/ml	15,6 µg/ml	31,3 µg/ml
0	2,3 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶
1	3,0 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁴	5,0 x 10 ³	2,0 x 10 ¹
2	8,0 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁵	6,0 x 10 ¹	<1	<1
4	4,0 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁴	2,0 x 10 ¹	<1	<1
24	7,1 x 10 ⁹	2,1 x 10 ⁹	6,9 x 10 ⁵	<1	<1

Sombreado: concentraciones que producen una reducción ≥3 log

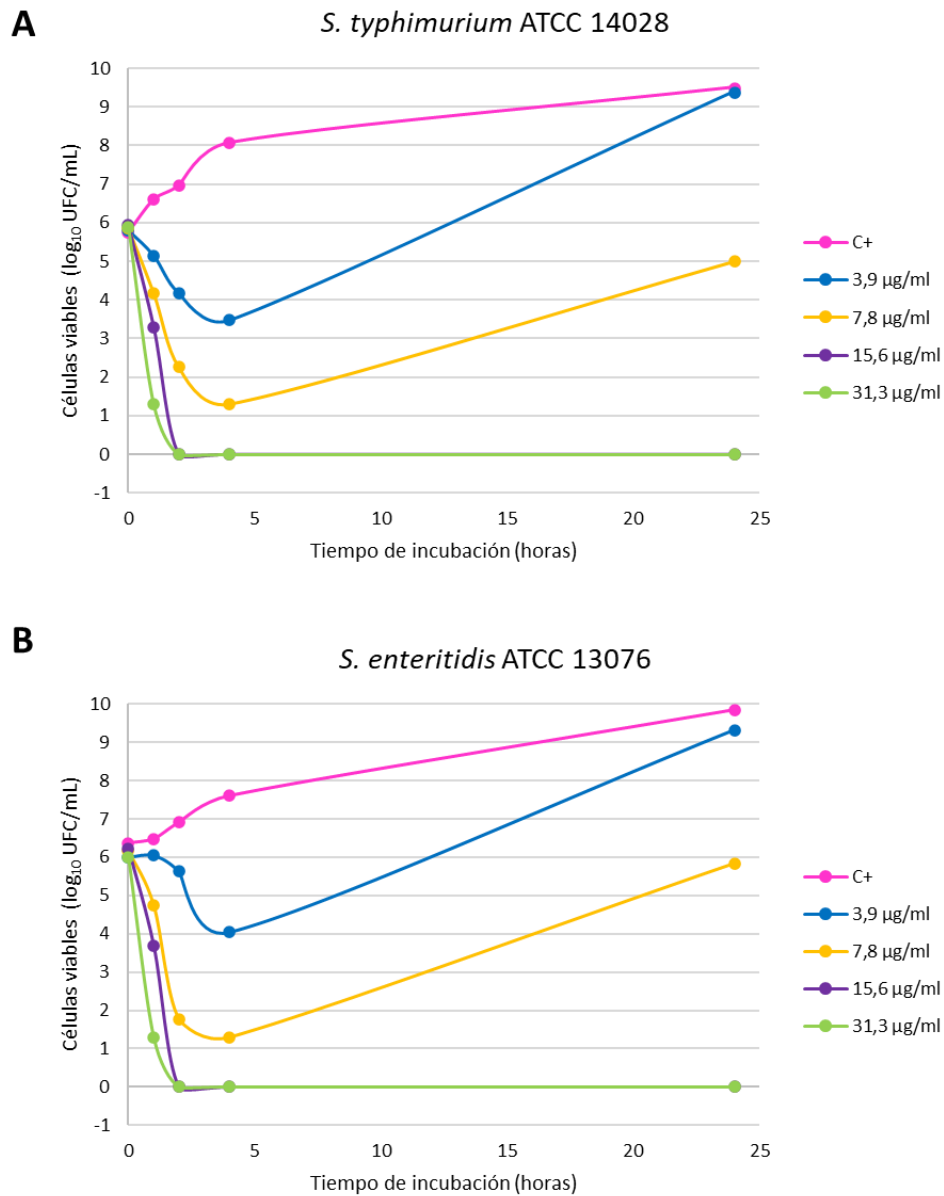


Figura 5.7. Curvas de inhibición del producto C3-L1 en medio líquido frente a **A)** *S. typhimurium* ATCC 14028 y **B)** *S. enteritidis* ATCC 13076.

Finalmente, las curvas de crecimiento con las cepas Gram positivas (Figura 5.8) confirmaron que ambas son más resistentes a la acción antimicrobiana del nanomaterial C3, observándose una resistencia superior con la cepa *S. aureus* SARM 3, positiva para el gen *mecA* (Figura 5.8B). En concreto, con la cepa *S. aureus* ATCC 6538 se observó el efecto bactericida con reducción logarítmica después de 24 h de incubación con 31,3

µg/ml y 62,5 µg/ml (Tabla 5.10), mientras que con *S. aureus* SARM 3, no se logró este efecto (Tabla 5.11).

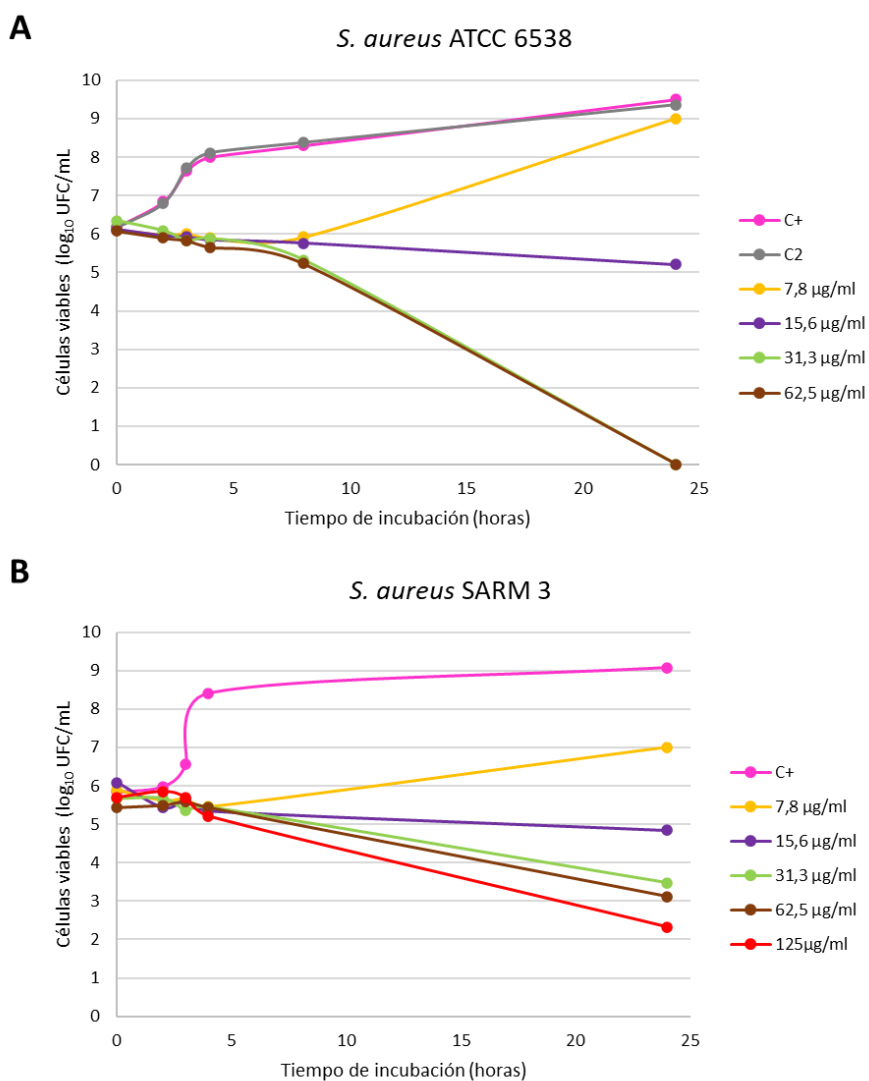


Figura 5.8. Curvas de inhibición del producto C3-L1 en medio líquido frente a **A)** *S. aureus* ATCC 6538 y **B)** *S. aureus* SARM 3

Las Tablas 5.10 y 5.11 muestran los resultados de células viables (UFC/ml) obtenidos en los diferentes tiempos y concentraciones ensayadas.

Tabla 5.10. Células viables de *S. aureus* ATCC 6538 (UFC/ml) tras la exposición a distintas concentraciones del producto C3-L1

Tiempo (h)	Sin producto		Producto C3			
	Control +	Producto C2	7,8 µg/ml	15,6 µg/ml	31,3 µg/ml	62,5 µg/ml
0	1,5 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶
1	7,0 x 10 ⁶	6,4 x 10 ⁶	9,6 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶	7,9 x 10 ⁵
2	4,4 x 10 ⁷	5,3 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁶	8,3 x 10 ⁵	6,6 x 10 ⁵	6,7 x 10 ⁵
4	1,0 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸	7,9 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁵
8	2,0 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸	8,3 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵
24	3,2 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁹	1,0 x 10 ⁹	1,6 x 10 ⁵	<1	<1

Sombreado: concentraciones que producen una reducción ≥ 3 log

Tabla 5.11. Células viables de *S. aureus* SARM 3 (UFC/ml) tras la exposición a distintas concentraciones del producto C3-L1

Tiempo (h)	Sin producto		Producto C3			
	Control +	7,8 µg/ml	15,6 µg/ml	31,3 µg/ml	62,5 µg/ml	125 µg/ml
0	6,9 x 10 ⁵	7,8 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶	4,6 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵
1	9,7 x 10 ⁵	4,2 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁵	7,1 x 10 ⁵
2	3,6 x 10 ⁶	4,7 x 10 ⁵	4,1 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁵	4,9 x 10 ⁵
4	2,6 x 10 ⁸	2,9 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵
24	1,2 x 10 ⁹	1,0 x 10 ⁷	6,9 x 10 ⁴	3,0 x 10 ³	1,3 x 10 ³	2,1 x 10 ²

4. Discusión

El objetivo de este trabajo ha sido determinar a través de diferentes ensayos *in vitro* las propiedades antibacterianas de un nanomaterial formado por caolín-plata para su posible inclusión en piensos de animales como alternativa al uso de antibióticos. Para lograr este objetivo, se seleccionaron distintas cepas bacterianas, entre las que se encontraban las clasificadas como bacterias ESKAPE, así como cepas resistentes a distintos antibióticos aisladas de entornos acuáticos (Pérez-Etayo et al., 2020) y granjas.

Los antibiogramas realizados mostraron la actividad bactericida en todas las cepas ensayadas (cepas Gram negativas y Gram positivas, susceptibles o resistentes a los antibióticos), lo que sugiere que estas nanopartículas de plata son agentes antibacterianos de amplio espectro. Estos resultados concuerdan con hallazgos anteriores descritos por otros equipos de investigación, en donde se comprobó que las nanopartículas de plata ejercen efecto sobre distintos grupos de bacterias (Lara et al., 2010; Dakal et al., 2016). En concordancia con nuestros resultados, otros trabajos muestran que las nanopartículas de plata son eficaces contra bacterias resistentes a antibióticos como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Doudi et al., 2013; Kar et al., 2016), *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Yuan et al., 2017) y Enterobacterias productoras de BLEE (Subashini et al., 2014). De igual modo, Kim et al. (2007) estudiaron la actividad antimicrobiana de unas AgNP contra *E. coli* y *S. aureus* y demostraron que *E. coli* se inhibía a concentraciones más bajas, mientras que los efectos inhibidores sobre el crecimiento de *S. aureus* eran menos marcados. De forma similar, nuestros resultados muestran que efectivamente la CMB del producto C3 es menor frente a bacterias Gram negativas (15,6 µg/ml para *E. coli* y *Salmonella* y 7,8 µg/ml para *P. aeruginosa*), mientras que se necesita mayor concentración de producto para destruir el 99,9% de la población inicial de bacterias Gram positivas (31,3 µg/ml y 250 µg/ml para *S. aureus*

ATCC 6538 y *E. faecium* ATCC 19434, respectivamente). Por otro lado, los resultados obtenidos por Loo et al. (2018) con otro tipo de nanopartículas de plata, muestran una CMB más baja para *E. coli* y *Salmonella*, mientras que estas concentraciones son más elevadas con las nanopartículas desarrolladas por Lara et al. (2010). Aunque la comparación de resultados sobre CMI y CMB es difícil, ya que no existe un método estándar ni puntos de corte para la determinación de la actividad antibacteriana de las distintas AgNPs desarrolladas, lo cierto es que las tendencias observadas son similares y apuntan hacia una mayor actividad frente a Gram negativas (Zarei et al., 2014). A pesar de las diferencias encontradas con la CMI/CMB, estos resultados también se correlacionan con las curvas de inhibición obtenidas en medio líquido, ya que esta metodología se considera más sensible, debido a que se realiza en mayor volumen y los microorganismos están en contacto continuo con las nanopartículas debido a la agitación constante. De esta manera, se necesitó más tiempo para observar el efecto bactericida del producto C3 sobre la viabilidad celular de *S. aureus* ATCC 6538 y *S. aureus* SARM3. Esto podría deberse a la diferencia estructural en la composición de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias, en concreto, a la forma en que interactúan las AgNPs con la pared celular (Franci et al., 2015). En esta misma línea, un estudio con *E. coli* confirmó que la acumulación de nanopartículas de plata en la membrana celular crea espacios en la bicapa, dando lugar a una mayor permeabilidad y finalmente muerte celular bacteriana (Rai et al., 2014). Por el contrario, la pared de las bacterias Gram positivas podría generar una mayor resistencia al ingreso de las nanopartículas (Flores et al., 2010). Así, una capa de peptidoglicano más gruesa actuaría como una barrera física contra las AgNP independientemente del mecanismo de acción involucrado, tal como se muestra en la Figura 5.9.

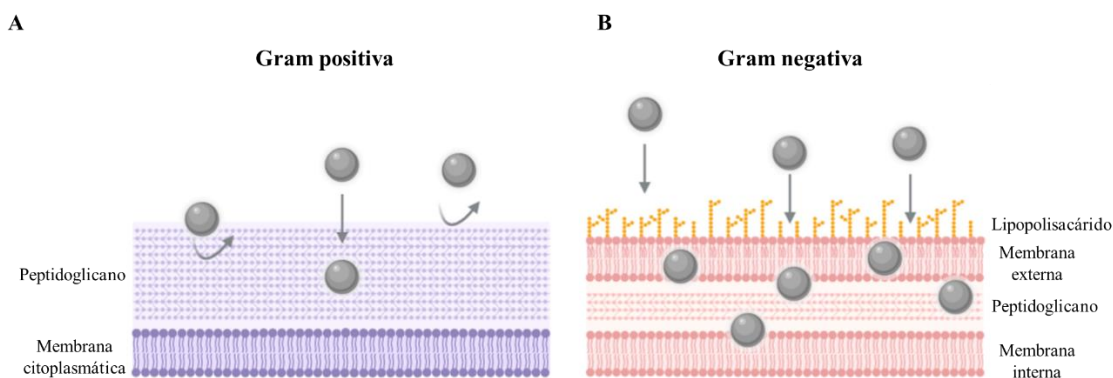


Figura 5.9. Modelo hipotético que muestra la interacción de las AgNPs frente a bacterias Gram positivas (A) y Gram negativas (B)

En definitiva, el material C3 ha sido capaz de destruir una alta concentración de bacterias (aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC/ml) en concentraciones relativamente bajas de plata (entre 7,8 y 15,6 $\mu\text{g/ml}$ para Gram negativos y 31,3 $\mu\text{g/ml}$ para Gram positivos, tras 24 h de exposición en agitación), por lo que de acuerdo con Loo et al. (2018), estos resultados indican que el nanomaterial caolín-plata desarrollado en este proyecto muestra un excelente efecto antimicrobiano.

Algunos autores han sugerido que la alimentación con nanopartículas de plata mejora la eficiencia digestiva, la inmunidad y el rendimiento en ganado y aves de corral (Saleh and El-Magd, 2018), aunque los estudios sobre los efectos en animales de producción son escasos.

Por ello, la introducción de estos novedosos materiales en animales y productos de consumo requiere evaluaciones de seguridad, así como una comprensión más clara de cualquier impacto potencial tanto en la salud humana como en el medio ambiente. De esta manera Abad-Álvarez et al. (2019), estudiaron los efectos sobre la retención de plata tisular en cerdos, utilizando unas nanopartículas de caolín-plata similares al producto C3. Los resultados mostraron que la plata se acumulaba en el hígado en el periodo de alimentación con el pienso complementado con el nanomaterial, y que los niveles de plata excretados en heces eran altos en comparación con los retenidos en los

tejidos del hígado. Por otro lado, no se encontró plata en valores significativos en los tejidos musculares, por lo que hace de esta tecnología una alternativa potencial como promotora del crecimiento. Sin embargo, se debe evaluar el impacto ambiental de las heces, dado el contenido de plata encontrado, lo que podría limitar su aplicación al suelo como práctica de manejo de estiércol.

En conclusión, las nanopartículas de caolín-plata (C3) desarrolladas en este proyecto mostraron una excelente actividad antibacteriana contra todos los patógenos testados, incluidas las cepas multirresistentes, por lo que, desde el punto de vista microbiológico, este producto cumple con las expectativas de ser un buen candidato como aditivo zootécnico en piensos de animales y reducir así el empleo de antibióticos. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales sobre viabilidad económica, seguridad animal e impacto ambiental, para evaluar la efectividad de la alternativa propuesta en el contexto de *One Health*.

Objetivo 4



DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO: Desarrollo de métodos de diagnóstico rápido y alternativas de tratamiento para infecciones causadas por Enterobacterias productoras de BLEE

CONTEXTO

Para finalizar esta tesis, nos centraremos en dos de los objetivos que recoge el nuevo PRAN 2019-2021 para controlar el avance de las resistencias antimicrobianas: el diagnóstico y el tratamiento.

Por un lado, existe la necesidad de promover el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido (PDR) para la determinación de los patrones de sensibilidad/resistencia que puedan ser interpretadas con criterios universales. Esto permitirá la elección precoz y adecuada de la prescripción antibiótica, evitando así tratamientos ineficaces. Hasta ahora, la incertidumbre que se genera en el proceso de diagnóstico bacteriano es una de las razones más importantes de esta prescripción innecesaria. De esta manera, en el **Capítulo 6** se ha llevado a cabo la puesta a punto de un método de diagnóstico rápido de cepas productoras de BLEE mediante la tecnología MALDI-TOF, en concreto utilizando el equipo VITEK-MS de bioMérieux en el modo de investigación (VITEK®-MS RUO).

Por otro lado, es necesario impulsar medidas alternativas o complementarias de tratamiento como nuevas herramientas para vencer las infecciones bacterianas causadas por microorganismos resistentes. En este sentido, en el **Capítulo 7** se han evaluado dos estrategias que en los últimos años están cosechando resultados prometedores. Así, se ha testado la actividad de péptidos antimicrobianos derivados de la proteína humana lactoferrina y de metabolitos producidos por determinadas bacterias lácticas frente a cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

Capítulo 6



Detección e identificación rápida de Enterobacterias productoras de BLEE y de carbapenemasas mediante tecnología MALDI-TOF MS

1. Introducción

En los capítulos anteriores ha quedado patente el grave problema de salud pública originado por las resistencias a los antibióticos, especialmente las infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE (Sultan et al., 2018). La detección e identificación precoz del tipo de resistencia causante permitiría establecer el tratamiento óptimo, evitando tratamientos empíricos que aportan mayor toxicidad, coste y presión antibiótica. En la actualidad, los métodos más habituales de diagnóstico microbiológico se fundamentan en el estudio del fenotipo, enfrentando la bacteria con el antibiótico (McLain et al., 2016). Este proceso requiere de un mínimo de 18-24 h de incubación, por lo que sería deseable acortar estos tiempos mediante el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos, sencillos y económicos. Entre los métodos rápidos más utilizados se encuentran las técnicas moleculares como la PCR, *microarrays*, citometría de flujo o la espectrometría de masas, en la que nos centraremos en este trabajo (Demirev et al., 2013; March-Rosselló, 2017).

La espectrometría de masas es una técnica empleada para el análisis cualitativo de estructuras orgánicas. A través de esta técnica, todo compuesto o molécula muestra un espectro específico dado por la masa de sus componentes (Angeletti and Ciccozzi, 2019). Uno de los espectrómetros de masas más utilizados hoy en día en el campo de la Microbiología es el MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*). Esta técnica consiste en una ionización por pulsos de láser de una muestra previamente co-cristalizada con una matriz polimérica, provocando la liberación de distintos iones, cada uno con un tiempo de vuelo diferente. De esta manera dada la correlación entre la masa del compuesto con su tiempo de vuelo, el aparato es capaz de generar el espectro del compuesto (Clark et al., 2013).

El equipo está provisto de tres partes fundamentales: una fuente de ionización, un analizador y un detector (Figura 6.1). En la cámara o fuente de ionización es donde ocurre la ionización y desorción de la muestra. El impacto del láser sobre la muestra provoca una desorción e ionización de los distintos analitos (esferas rojas, azules y naranjas) embebidos en la matriz (esferas verdes). Un campo eléctrico acelera los analitos a una velocidad directamente dependiente de su ratio masa/carga (m/z). Una vez en el analizador de masas por tiempos de vuelo, se mide con precisión el tiempo que los analitos tardan en llegar al detector de partículas. Según ese tiempo el aparato es capaz de calcular el ratio m/z de los analitos que establece la relación masa/carga por tiempo de vuelo y finalmente, el detector de iones unido a un equipo informático procesa los datos dando lugar a un espectro de masas, que enfrenta la intensidad de la señal en el eje Y con la relación masa/carga de la molécula, en el eje X (Dekker and Branda, 2011; Wieser et al., 2012).

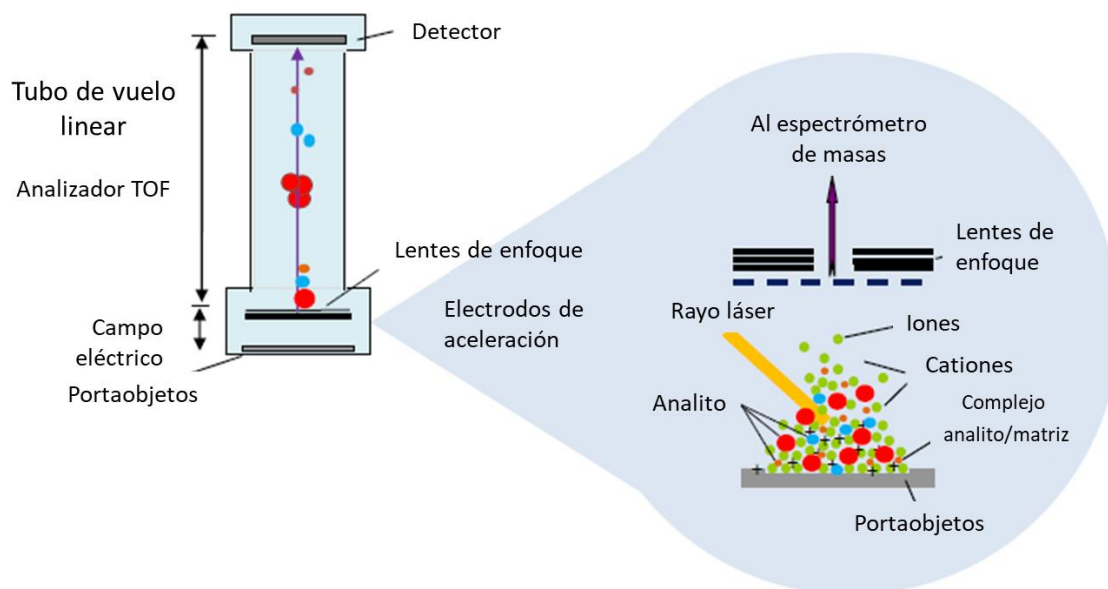


Figura 6.1. Representación esquemática de la identificación de muestras orgánicas mediante MALDI-TOF MS. Adaptación de la Figura desarrollada por Wieser et al. (2012).

El MALDI-TOF MS se utiliza satisfactoriamente para la identificación de microorganismos bacterianos y fúngicos, pero desde hace unos años se ha incrementado

el interés por su utilización para la detección rápida de distintos mecanismos de resistencia a antibióticos (Oviaño, 2019). La idea se fundamenta en la detección indirecta de la actividad enzimática, es decir, estudiar las modificaciones inducidas en los antibióticos por la acción de las enzimas β -lactamasas presentes en la bacteria bajo estudio (Sparbier et al., 2012). La actividad de estas enzimas produce una hidrólisis del antibiótico, dando lugar a un cambio molecular que modifica el espectro del mismo. Además, algunos antibióticos tras ser hidrolizados sufren una descarboxilación, que de nuevo modificará su espectro (Hrabák et al., 2013).

Hasta la fecha, varios trabajos han demostrado la detección de actividad β -lactamasas y carbapenemasas por esta metodología (Hrabák et al., 2011, 2012; Oviaño et al., 2014, 2016, 2017; Dortet et al., 2018), pero la mayoría se han realizado con el equipo MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Alemania) por su mayor desarrollo en los programas necesarios para el análisis de espectros antibióticos. De esta manera, se conocen los picos de masas y las formas moleculares correspondientes de varios antibióticos, tanto en su forma original (patrones de sensibilidad) como hidrolizada (patrones de resistencia) (Sparbier et al., 2012; Oviaño et al., 2017).

Sin embargo, muchos laboratorios de diagnóstico clínico trabajan con el segundo equipo disponible actualmente en el mercado (VITEK[®] MS, bioMérieux, Francia), para el que apenas hay estudios publicados sobre su posible utilización para la detección de resistencias (Knox et al., 2014; Carvalhaes et al., 2015). Por ello, el objetivo de este capítulo ha sido poner a punto la metodología de detección rápida de Enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas utilizando el equipo VITEK[®] MS (bioMérieux).

2. Material y métodos

2.1. Selección de cepas

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron 8 cepas de Enterobacterias productoras de BLEE que presentaban distintos tipos de genes *bla* (SHV-12, CTX-M1 y CTX-M15) o bien eran productoras de carbapenemasas del tipo KPC. Aunque la mayor parte procedían de aislados clínicos, las 2 cepas productoras de carbapenemasas fueron aisladas de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) (Pérez-Etayo et al., 2020). Las principales características de estas cepas se muestran en la Tabla 6.1. Como control negativo se utilizó una cepa de *E. coli* no productora de BLEE, procedente de la colección española de cultivos tipo (*E. coli* CECT 516, ATCC 8739).

A partir de las cepas congeladas a -135°C , se realizó un pase a placas de TSA (Scharlab S.L., Sentmenat, España) para la obtención de las cepas de trabajo (incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 18-24 h).

Tabla 6.1. Principales características de las cepas empleadas en este estudio

N° cepa	Código	Origen	Especie	β-lactamasa	Filogruppo	ST	CC ¹	Perfil de resistencia a antibióticos ²							
								Penicilinas	Cefalosporinas	Monobactams	Inhibidores β-lactamasas	Carbapenems	Quinolonas	Tetracinas	Otros
1	C38	Clínico	<i>E. coli</i>	CTX-M15	A	ST510	10CC	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	CIP, MXF	TET	SXT
2	C41	Clínico	<i>E. coli</i>	CTX-M1	D	ST844	NA	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	-	TET	-
3	C43	Clínico	<i>E. coli</i>	CTX-M15	A	ST650	23CC	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	-	-	CIP, MXF	TET	CHL
4	C64	Clínico	<i>E. coli</i>	CTX-M1	A	ST359 6	NA	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMS	-	-	TET	SXT
5	C71	Clínico	<i>E. coli</i>	SHV-12	A	ST90	23CC	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CAZ, FEP	AZT	-	-	LV, CIP, MXF	-	-
6	C89	Clínico	<i>E. coli</i>	SHV-12	A	ST90	23CC	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CAZ, FEP	AZT	-	-	LV, CIP, MXF	TET	CHL
7	E33-1	EDAR	<i>E. coli</i>	TEML-278, KPC	A	ST52	NA	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	ETP, MER, IMP	LV, CIP, MXF, NOR	-	SXT, FOT
8	E33-2	EDAR	<i>C. freundii</i>	TEML-278, KPC	-	-	-	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	ETP, MER, IMP	MXF	-	FOT

¹ NA: no asociado

²AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; MZ, mezlocilina; CZ, cefazolina; CXM, cefuroxima; CPD, cefpodoxima; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FOX, cefoxitina; FEP, cefepime; AZT, aztreonam; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; AMS, ampicilina-sulbactam; TZP, piperacilina-tazobactam; ETP, ertapenem; MER, meropenem; IMP, imipenem; GM, gentamicin; TO, tobramicina; LV, levofloxacin; CIP, ciprofloxacino; MXF, moxifloxacin; NOR, norfloxacino, TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; FOT, fosfomicina; CHL, cloranfenicol, COL, colistina.

2.2. Antibióticos e inhibidores de β -lactamasas

Para estudiar la presencia de β -lactamasas de espectro extendido se utilizaron distintas cefalosporinas: ceftazidima (0,25 mg/ml), ceftriaxona (0,5 mg/ml) y cefotaxima (0,5 mg/ml), mientras que el ácido clavulánico (0,05 mg/ml) se utilizó como inhibidor de estas enzimas. Se emplearon cepas portadoras del gen de resistencia que codifica la proteína SHV-12 para detectar la hidrólisis de la ceftazidima, mientras que se utilizaron cepas del grupo CTX-M para la hidrólisis de ceftriaxona y cefotaxima (CTX-M15 y CTX-1, respectivamente), debido al poder hidrolítico de dichas enzimas sobre estos antibióticos (Paterson and Bonomo, 2005; Nordmann et al., 2012). Para detectar la actividad enzimática producida por carbapenemasas del tipo KPC se utilizó el ertapenem (0,5 mg/ml). Todos los antibióticos fueron suministrados por Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se prepararon distintas soluciones patrón de los antibióticos o inhibidor de β -lactamasa en H₂O desionizada tipo II (Wasserlab, Noáin, España).

2.3. Solución de reacción

En primer lugar, se prepararon dos soluciones stock:

- Solución 10x de bicarbonato: 158,1 mg de NH₄CO₃ (Sigma-Aldrich) en 20 ml de H₂O desionizada tipo II.
- Solución de zinc: 10 mg de ZnCl₂ (Sigma-Aldrich) en 1 ml de H₂O desionizada tipo II.

La solución de reacción (10 mM NH₄CO₃, ZnCl₂ 10 μ g/ml y 0,005% SDS, pH=8) se preparó añadiendo 1 ml de la solución de bicarbonato, 10 μ l de la solución de zinc y 0,5 mg de SDS (Sigma-Aldrich) a 9 ml de H₂O desionizada tipo II.

2.4. Matriz

Se utilizó la matriz orgánica comercial HCCA (ácido α -ciano-3,4-hidroxicinámico) (bioMérieux). Es importante comprobar que la solución de matriz es

incolora y no hay restos de cristales amarillos en suspensión, ya que pueden dificultar la lectura del espectro de masas.

2.5. Calibración

La calibración mensual del equipo se llevó a cabo por el personal técnico de bioMérieux, para confirmar que los parámetros del equipo eran los óptimos para realizar correctamente las lecturas. Además, en cada experimento se añadió la matriz de manera independiente, para comprobar si se producía o no un desplazamiento de los picos de masas detectados respecto a los espectros obtenidos con el equipo MALDI Biotyper de Bruker (Sparbier et al., 2012).

2.6. Detección de BLEE y carbapenemasas mediante el sistema VITEK MS

Se utilizó el sistema SARAMIS v4.12 VITEK[®]-MS plus RUO (bioMérieux) para la detección precoz de las cepas productoras de β -lactamasas y carbapenemasas. Para ello, se siguieron dos estrategias diferentes (en presencia y ausencia de solución de reacción), probando distintos tiempos de incubación en ambas para establecer el tiempo óptimo. En general, las muestras se incubaron a 30 y 60 min, aunque para alguno de los antibióticos se necesitó alargar el tiempo de incubación hasta 120 y 180 min.

En primer lugar, se estudió si era necesario añadir una solución de reacción (apartado 2.3) y se siguió el protocolo desarrollado por Oviaño et al. (2017). En un tubo con 1 ml de solución de reacción se añadieron 50 μ l de la solución antibiótica pertinente y se inoculó con un asa de siembra desechable de 1 μ l el correspondiente cultivo bacteriano fresco (TSA, 37°C, 24 h). A continuación, se incubó en agitación a 37°C \pm 1°C durante el tiempo correspondiente.

En segundo lugar, se siguió el protocolo descrito por Sparbier et al. (2012), inoculando con asa de siembra calibrada (1 μ l) el cultivo bacteriano fresco en un tubo que contenía 10 μ l de la solución antibiótica, con incubación posterior a 37°C \pm 1°C

durante el tiempo seleccionado. En ambos casos, una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados (Fisher Micro Centrifuge Model 235A) a 12.000 X g. durante 2 min y se tomó una fracción del sobrenadante para su posterior análisis.

2.6.1. Preparación de la muestra de ensayo

Se utilizaron unos portaobjetos de acero inoxidable especiales para el VITEK[®]-MS (FLEXI MASS[™], bioMérieux), que disponen de 48 pocillos, con un pocillo extra en el centro de cada grupo (Figura 6.2). A cada pocillo se añadió 1 µl del sobrenadante obtenido tras los distintos tiempos de incubación. Además, se incluyó un pocillo control para obtener el espectro del antibiótico correspondiente, para lo que se añadió directamente 1 µl de la solución antibiótica. Una vez dispuestas y secas a T ambiente todas las muestras sobre el portaobjetos, se añadió 1 µl de matriz HCCA (bioMérieux) a cada pocillo. La matriz polimeriza con la muestra y se seca a temperatura ambiente para poder ser leída en el espectrómetro de masas. Finalmente, se introdujo el portaobjetos en el equipo para realizar las lecturas correspondientes.



Figura 6.2. Portaobjetos de acero inoxidable (FLEXI MASS[™], bioMérieux). El pocillo central sirve para inocular el control o calibrador y el código de barras para tener un registro e identificación de la placa.

2.6.2. Condiciones de ensayo en el equipo

Una vez introducido el portaobjetos en el equipo VITEK[®]-MS se establecen las condiciones de ensayo, que en este estudio han sido las siguientes:

- Sistema VITEK[®]-MS plus RUO
- Láser de nitrógeno de 60 Hz
- Fuente de iones 1 [IS1]: 20 kV
- Fuente de iones 2 [IS2]: 17'5 kV
- Lentes: 6'5 kV
- Detector: 2650 V
- Rango de detección de masas: 100-1000 Da

Establecidos los parámetros, el equipo genera un vacío y cuando está listo ya se puede bombardear cada pocillo mediante el disparo de pulsos cortos de láser. El bombardeo de cada pocillo se realizó de forma manual, con el programa Shimadzu Biotech Axima Assurance 2.9.3 (bioMérieux). En ese momento, cada muestra es ionizada y gracias al vacío generado dentro del equipo, las moléculas ionizadas se vaporizan. Mediante el voltaje generado, estas moléculas viajan hasta un detector que mide el tiempo de vuelo generado y lo relaciona con la masa molecular del analito. De esta manera, el sistema VITEK[®]-MS produce el espectro de masas acorde al tiempo de vuelo.

2.6.3. Interpretación de resultados

Los picos de masas originados se identificaron según las referencias encontradas en el trabajo de Sparbier et al. (2012) teniendo en cuenta el desplazamiento observado en el espectro de la matriz HCCA. En la Tabla 6.2 se muestran los picos de masas de los antibióticos estudiados, en su forma original (patrón de sensibilidad) y en su forma hidrolizada (patrón de resistencia). Se utilizó el programa mMass (versión 5.5.0) (<http://www.mmass.org/>) para el análisis de los distintos espectros obtenidos.

Tabla 6.2. Picos de masas (Da) de los distintos antibióticos en su forma original (patrón de sensibilidad) e hidrolizados (patrón de resistencia) (Sparbier et al., 2012)

Antibiótico ²	Patrón de sensibilidad (Da) ¹										Patrón de resistencia (Da) ¹							
	MW [g/mol]	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ⁺	[M+3Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+Na+K] ⁺	[M-X+K] ⁺	[M-X-CO+H] ⁺	[M-X-CO ₂ +H] ⁺	[Mhidrol+H] ⁺	[Mhidrol+Na] ⁺	[Mhidrol+2Na] ⁺	[Mhidrol+Na+K] ⁺	[Mhidrol-CO ₂ +H] ⁺	[Mhidrol-CO ₂ +Na] ⁺	[Mhidrol-CO ₂ +K] ⁺	[Mhidrol-X+K] ⁺
Cefotaxima	455,5	456,6	478,5					396,5									414,5	370,5
Ceftazidima	546,6	547,6						468,6									486,6	442,6
Ceftriaxona	554,6	555,6	577,6				616,6	396,6	368,6	324,6							414,6	370,6
Ertapenem	475,5	476,5	498,5	520,5	542,5	514,5	536,5				494,5	516,5	538,5	554,5	450,5	472,5	488,5	

¹ Los términos sensibilidad y resistencia mediante MALDI-TOF MS se refieren al patrón de masas característico del antibiótico sin modificaciones y al hidrolizado, respectivamente.

² X, acetil para cefotaxima, piridin para ceftazidima y triazin-ytiol para ceftriaxona.

3. Resultados

3.1. Espectro matriz HCCA

En cada experimento se añadió la matriz HCCA de manera independiente en uno de los pocillos centrales del portaobjetos. De esta manera, se comprobó el desplazamiento de los picos de la matriz (desde -2 a -4 Da), según los valores publicados por Sparbier et al. (2012) (Figura 6.3). El desplazamiento de estos picos nos permitió determinar posteriormente los picos de masas correspondientes a cada antibiótico.

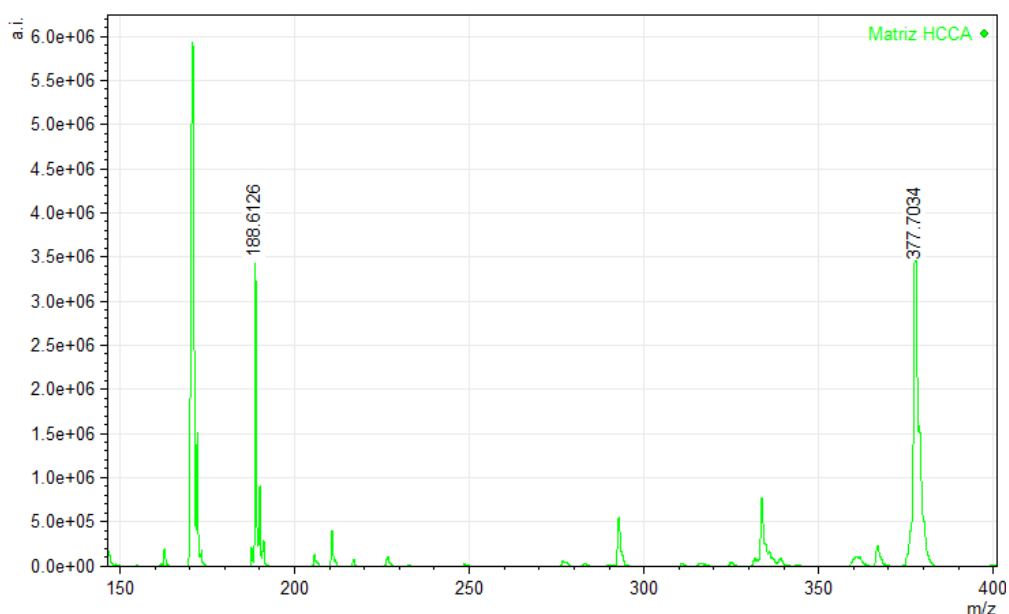


Figura 6.3. Ejemplo de un espectro generado de la matriz HCCA. El eje vertical muestra la intensidad y el horizontal la relación masa/carga (m/z) expresada en Daltons (Da). Se comprueba el desplazamiento de -2 Da en comparación con el valor de la matriz del trabajo de Sparbier et al. (2012) ($[M+H]^+$ a 190 Da y $[2M+H]^+$ a 379 Da).

3.2. Detección de actividad BLEE

3.2.1. Ceftazidima

Para estudiar la hidrólisis de este antibiótico, se emplearon dos cepas portadoras de *bla*_{SHV-12} (Cepas C71 y C89, Tabla 6.1) dado que este tipo de β -lactamasas hidrolizan con más eficacia la ceftazidima (Nordmann et al., 2012). De acuerdo con los resultados de otros grupos de investigación (Oviaño, 2019) y con el fin de establecer el tiempo

óptimo de incubación para la detección de actividad enzimática, se realizaron incubaciones de hasta 180 min.

La Figura 6.4 refleja los espectros de masas obtenidos. En el apartado A se muestra el espectro del control negativo (*E. coli* ATCC 8739 con ceftazidima), con los picos característicos del patrón de sensibilidad sombreados en gris (464 Da y 544 Da). El espectro del antibiótico en ausencia de microorganismos dio lugar al mismo patrón al igual que los espectros obtenidos con ácido clavulánico tras 60 min de incubación (datos no mostrados). Los apartados B, C y D muestran a modo de ejemplo la hidrólisis producida por la cepa C71, aunque los resultados fueron idénticos con la cepa C89. La aparición de los picos de resistencia (sombreados en rojo) de 439 y 483 Da no se produjo hasta los 60 min de incubación (Figura 6.4C), mientras que este último pico tampoco se apreció a los 180 min de incubación (Figura 6.4D). Además, en ninguna de las condiciones de incubación se produjo la desaparición de los picos sensibles, ni siquiera al aumentar el tiempo de incubación hasta 180 min (Figura 6.4D) y tampoco se observaron diferencias entre la adición o no de solución de reacción (datos no mostrados).

Por tanto, como en ninguna de las condiciones de hidrólisis ensayadas se produjo la desaparición de los picos sensibles, no se recomienda el uso de ceftazidima para la detección de resistencias mediante MALDI-TOF con el equipo VITEK®MS (bioMérieux).

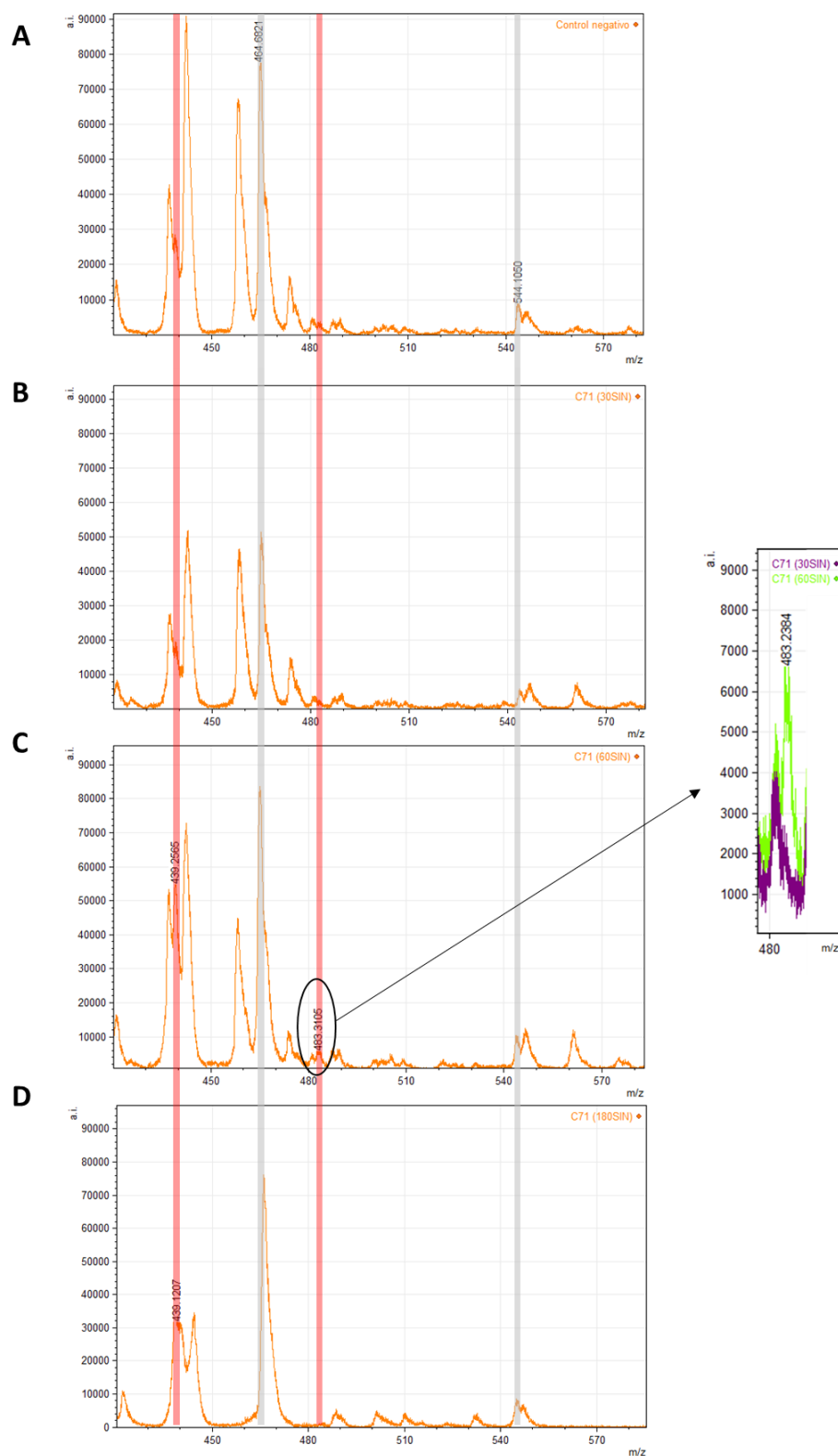


Figura 6.4. Espectros de masas de ceftazidima en ausencia de solución de reacción. **A)** Control negativo: *E. coli* ATCC 8739-ceftazidima, **B)** Hidrólisis de ceftazidima con la cepa C71 durante 30 min de incubación; **C)** Hidrólisis de ceftazidima con la cepa C71 durante 60 min de incubación; **D)** Hidrólisis de ceftazidima con la cepa C71 durante 180 min de incubación. Los picos de sensibilidad se indican sombreados en gris, mientras que los picos de resistencia se muestran sombreados en rojo. Se realizaron al menos dos repeticiones de cada ensayo de hidrólisis.

3.2.2. Ceftriaxona

La hidrólisis de ceftriaxona se estudió empleando dos cepas portadoras de *bla*_{CTX-M15} (Cepas C38 y C43, Tabla 6.1). En la Figura 6.5 se puede observar los espectros de masas obtenidos con la cepa C38, aunque los resultados de la cepa C43 fueron similares (datos no mostrados). De forma similar a lo observado con la ceftazidima, los picos de sensibilidad (321, 365, 393, 552, 574 y 618 Da; sombreados en gris), no desaparecieron ni a los 30 (Figura 6.5B) ni a los 60 min de incubación (Figura 6.5C). Sin embargo, la hidrólisis fue más rápida y se detectaron los picos de resistencia de 414 Da ([Mhidrol-triazin-ytiol+K]⁺) y 370 Da ([Mhidrol-triazin-ytiol-CO₂+H]⁺) con tan solo 30 min de incubación y sin el empleo de solución de reacción (Figura 6.5B). Por último, los espectros de masas obtenidos con ácido clavulánico mostraron la desaparición de estos picos resistentes (Figura 6.5D), pero una vez más, como el protocolo de hidrólisis no fue eficaz ya que los picos sensibles no desaparecieron, tampoco se recomienda el empleo de este antibiótico para la detección de resistencias mediante el equipo VITEK®MS (bioMérieux).

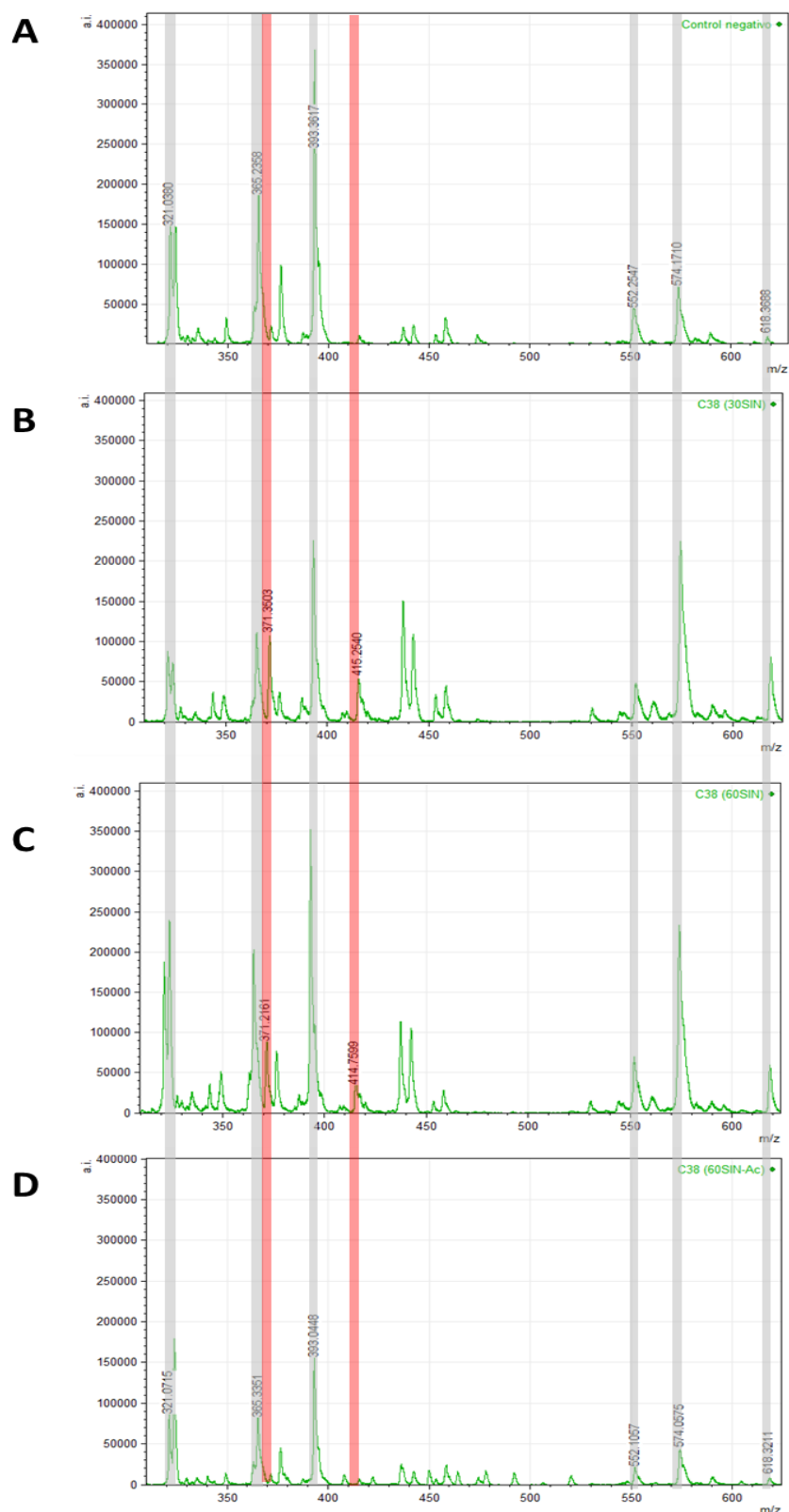


Figura 6.5. Espectros de hidrólisis de ceftriaxona en ausencia de solución de reacción. **A)** Control negativo: *E. coli* ATCC 8739-ceftriaxona, **B)** Hidrólisis de ceftriaxona con la cepa C38 durante 30 min de incubación. **C)** Hidrólisis de ceftriaxona con la cepa C38 durante 60 min de incubación. **D)** Hidrólisis de ceftriaxona-ac.clavulánico con la cepa C38 durante 60 min de incubación. Los picos de sensibilidad se indican sombreados en gris, mientras que los picos de resistencia se muestran sombreados en rojo. Se realizaron al menos dos repeticiones de cada ensayo de hidrólisis.

3.2.3. Cefotaxima

Finalmente, la hidrólisis de la cefotaxima se estudió con dos cepas portadoras de *bla*_{CTX-M1} (Cepas C41 y C64, Tabla 6.1), debido a que este tipo de β -lactamasas tienen una potente actividad hidrolítica sobre este antibiótico. A modo de ejemplo, la Figura 6.6 muestra los espectros obtenidos con la cepa C41, aunque los resultados fueron idénticos para ambas cepas. El apartado A refleja el patrón de sensibilidad obtenido con el control negativo (*E. coli* ATCC 8739) dando lugar a los picos de masas de 393, 453 y 475 Da. En el apartado B se puede observar cómo se ha producido una hidrólisis completa de la cefotaxima con 60 min de incubación, dando lugar al patrón de resistencia de 367 Da [Mhidrol-acetil-CO²+H]⁺ y 411 Da [Mhidrol-acetil+K]⁺ (picos sombrados en rojo) y una desaparición total de los tres picos de sensibilidad. En este caso la hidrólisis completa ocurrió a los 60 min de incubación, ya que a los 30 min todavía no habían desaparecido por completo los picos de sensibilidad (datos no mostrados). Además, el estudio realizado en presencia de ácido clavulánico (Figura 6.6C) mostró la inhibición de la actividad BLEE de la cepa, obteniéndose solamente los picos sensibles (393, 453 y 475 Da) al igual que en el control negativo.

En todos los casos, el protocolo que utilizó la solución de reacción no fue capaz de detectar las formas hidrolizadas (datos no mostrados), por ello no se recomienda su uso en el procedimiento de hidrólisis de antibióticos β -lactámicos.

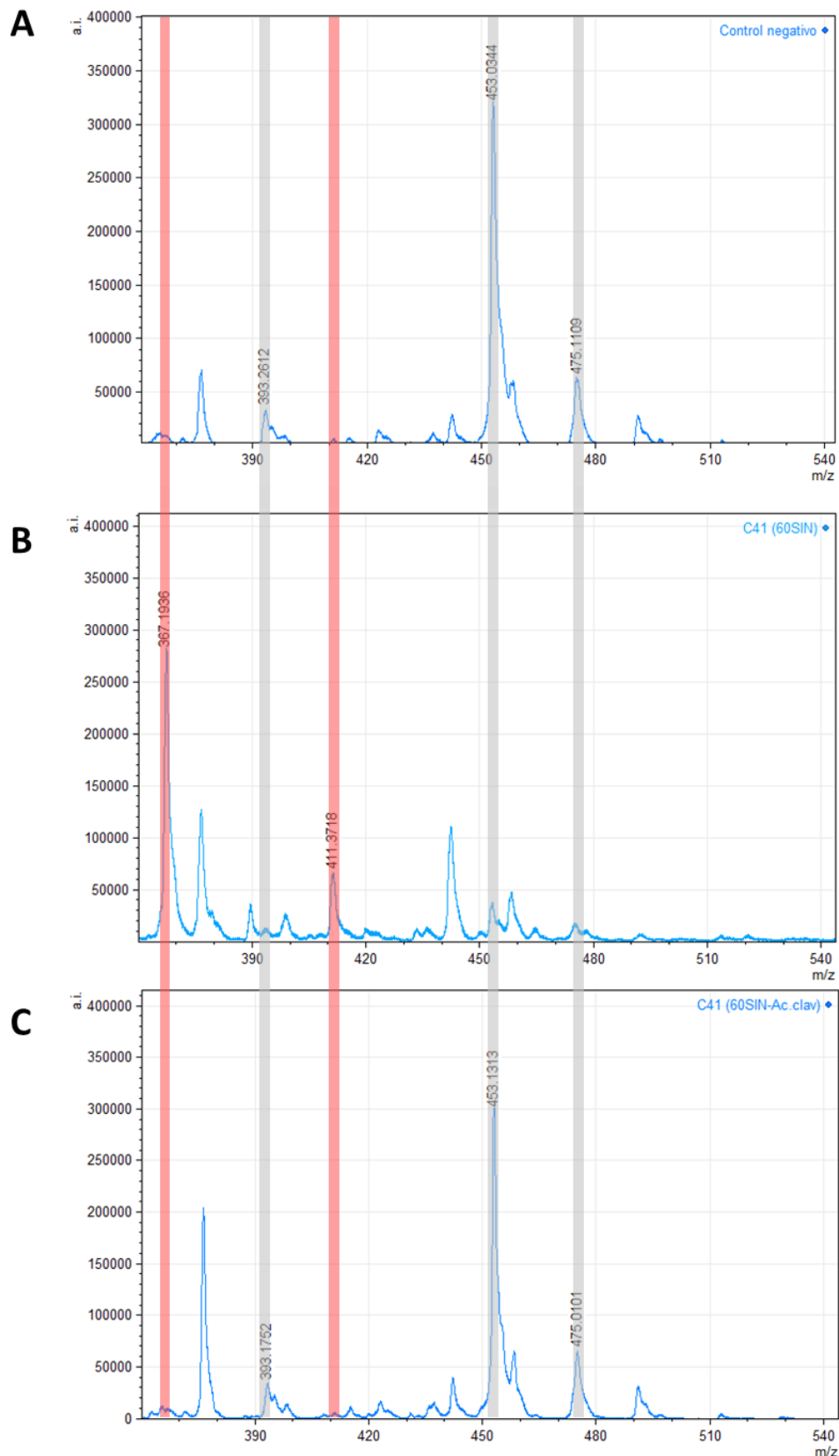


Figura 6.6. Espectros de hidrólisis de cefotaxima en ausencia de solución de reacción. **A)** Control negativo: *E. coli* ATCC 8739-cefotaxima, **B)** Hidrólisis de cefotaxima con la cepa C41 durante 60 min de incubación. **C)** Hidrólisis de cefotaxima-Ac. clavulánico con la cepa C41 durante 60 min de incubación. Los picos de sensibilidad se indican sombreados en gris, mientras que los picos de resistencia se muestran sombreados en rojo. Se realizaron al menos dos repeticiones de cada ensayo de hidrólisis.

3.3. Detección de actividad carbapenemasa

El estudio se llevó a cabo con el antibiótico ertapenem y dos cepas productoras de carbapenemasas tipo KPC (*E. coli* E33-1 y *C. freundii* E33-2; Tabla 6.1). Tal como se puede observar en la Figura 6.7A, la detección de los picos sensibles (sombreados en gris) en el control negativo se produjo correctamente y todos éstos desaparecieron cuando se produjo la hidrólisis del ertapenem con 60 min de incubación (Figuras 8.8B, 8.8C y 8.8D). Los resultados de hidrólisis fueron iguales en ambas cepas (*E. coli* espectro coloreado en azul y *C. freundii* color naranja) y el empleo de la solución de reacción mejoró la detección de más formas hidrolizadas en el patrón de resistencia (Figura 6.7D), a diferencia de los resultados obtenidos con la hidrólisis de las cefalosporinas. Sin embargo, esta hidrólisis no fue efectiva en su totalidad por varias razones. En primer lugar, de los 7 picos que componen el patrón de resistencia, solamente se detectaron 5 (aunque el pico de 551 Da $[M_{hidrol}+Na+K]^+$ mostró una intensidad muy pequeña), no manifestándose los picos de 485 Da $[M_{hidrol}-CO_2+K]^+$ y 513 Da $[M_{hidrol}+Na]^+$. Por otro lado, tanto el pico de 447 Da $[M_{hidrol}-CO_2+H]^+$ como el de 469 Da $[M_{hidrol}-CO_2+Na]^+$, también aparecieron en el control negativo (Figura 6.7A), por lo que no se puede confirmar que estos picos correspondan con exclusividad al patrón resistente.

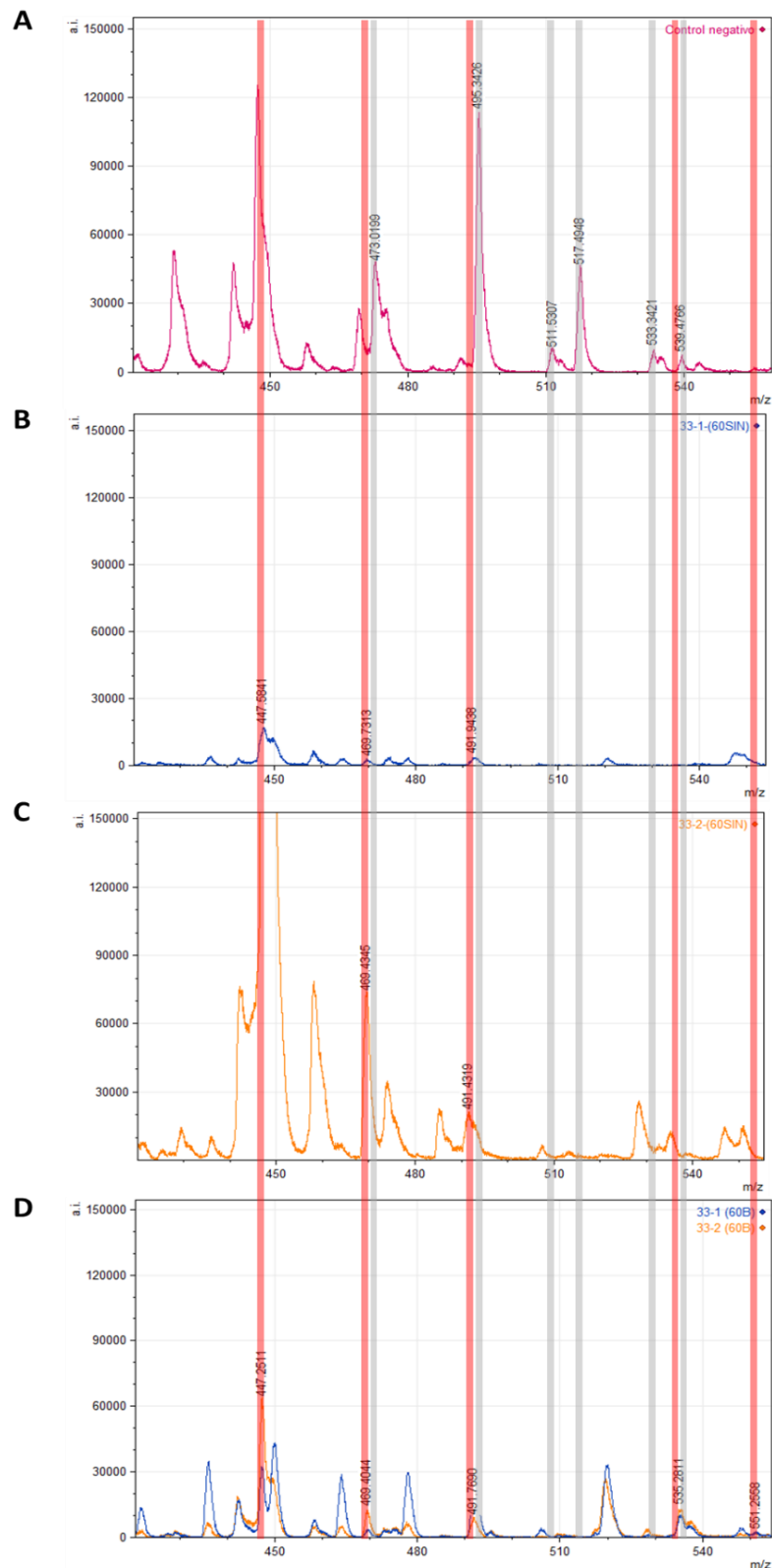


Figura 6.7. Espectros de hidrólisis del ertapenem. **A)** Control negativo: *E. coli* ATCC 8739-ertapenem, **B)** Hidrólisis con la cepa *E. coli* 33-1 durante 60 min en ausencia de solución de reacción, **C)** Hidrólisis con la cepa *C. freundii* 33-2 durante 60 min en ausencia de solución de reacción, **D)** Hidrólisis de ertapenem con ambas cepas durante 60 min de incubación en presencia de solución de reacción. Los picos de sensibilidad se indican sombreados en gris, mientras que los picos de resistencia se muestran sombreados en rojo. Se realizaron al menos dos repeticiones de cada ensayo de hidrólisis.

4. Discusión

Dado el aumento de cepas nosocomiales y comunitarias que presentan β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), su detección e identificación precoz cobra especial importancia para llevar a cabo un diagnóstico óptimo y una elección adecuada del tratamiento, evitando el uso de terapias empíricas. Gracias a su versatilidad, el MALDI-TOF MS se está introduciendo en los laboratorios de Microbiología clínica como una alternativa para la detección de diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos. Esta metodología se basa en el análisis directo de la reacción enzimática producida sobre la molécula antibiótica. Por tanto, este ensayo es mucho más rápido y los resultados están disponibles en tan solo unas horas. Así, el objetivo general de este trabajo ha sido poner a punto la detección de Enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas utilizando el equipo VITEK[®] MS RUO (bioMérieux), ya que hasta la fecha no se dispone de protocolos armonizados que permitan la detección de resistencias antimicrobianas con el equipo de esta casa comercial.

La detección directa de actividad β -lactamasa se llevó a cabo mediante el estudio de hidrólisis de tres cefalosporinas: ceftazidima, ceftriaxona y cefotaxima. La hidrólisis de la ceftazidima no fue eficaz con ninguno de los protocolos ensayados, por lo que no es un antibiótico recomendable como primera elección para el análisis de BLEEs. Oviaño et al. (2017) obtuvieron resultados similares con el MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Alemania), con una sensibilidad inferior al 90% y un tiempo de incubación recomendando de 3 h. Estos mismos autores confirmaron que la ceftriaxona es el antibiótico que ofrece una mayor sensibilidad y especificidad, además de ser necesario un menor tiempo de detección. Así, con 30 min de incubación observaron una hidrólisis positiva tanto en el caso de bacterias que producen BLEEs como AmpC (Oviaño, 2019). Sin embargo, en nuestro estudio a pesar de obtener los picos de resistencia de 414 Da

([Mhidrol-triazin-ytiol+K]⁺) y 370 Da ([Mhidrol-triazin-ytiol-CO₂+H]⁺) con 30 min, los picos de sensibilidad no desaparecieron, ni incluso aumentando el tiempo de incubación.

Por el contrario, sí se ha conseguido detectar una correcta hidrólisis de la cefotaxima tras 60 min de incubación con el equipo VITEK[®] MS (bioMérieux), obteniéndose el patrón de resistencia y disminución de picos de sensibilidad, que se recuperaron en presencia de ácido clavulánico. Estos resultados son coincidentes con lo reportado por Oviaño et al. (2017), que recomiendan 1 hora de incubación para este antibiótico y obtienen un nivel de sensibilidad >90%. Así pues, el protocolo finalmente desarrollado consiste en inocular el cultivo bacteriano fresco (asa de 1 µl) en un tubo con 10 µl de la solución de cefotaxima e incubar a 37°C ± 1°C durante 60 min. Posteriormente los tubos se centrifugan a 12.000 X g durante 2 min y se toma 1 µl del sobrenadante para su posterior análisis. Se observó un desplazamiento de entre -2 a -3 Da en los picos de sensibilidad/resistencia obtenidos respecto a los establecidos por Sparbier et al. (2012). De esta forma, el patrón de sensibilidad de la cefotaxima con el equipo VITEK[®] MS se instauró de la siguiente forma: 393 Da [M+acetil+K]⁺, 453 Da [M+H]⁺, y 475 Da [M+Na]⁺, mientras que los picos de resistencia se correspondieron con 367 Da [Mhidrol-acetil-CO₂+H]⁺ y 411 Da [Mhidrol-acetil+K]⁺.

En cuanto al estudio de resistencia a carbapenémicos, varios trabajos han descrito los patrones por espectrometría de masas del meropenem, ertapenem e imipenem (Lasserre et al., 2015; Papagiannitsis et al., 2015). El imipenem es el que ha mostrado una mayor sensibilidad (superior al 95%) y un menor tiempo de incubación (Oviaño, 2019). Sin embargo, este antibiótico presenta la desventaja de que los picos de hidrólisis no son detectables y además, tal como señalan Knox et al. (2014), la sensibilidad con el equipo VITEK-MS es menor. Por ello, en este estudio se seleccionó

el ertapenem como antibiótico para detectar la resistencia frente a carbapenemasas del tipo KPC. A pesar de no haber podido lograr la detección de todos los picos propuestos por Sparbier et al. (2012) (Tabla 6.2), el empleo de la solución de reacción permitió detectar mejor los picos de resistencia, de forma similar a lo sugerido por Oviaño et al. (2016). Por su parte, Carvalhaes et al. (2015) determinaron que cuando se empleaba el antibiótico ertapenem, la sensibilidad del equipo VITEK-MS dependía del tipo de carbapenemasa presente. Así, las de clase A (entre las que se incluyen las KPC) y B necesitaban menor tiempo de incubación, logrando un 62% y un 87% de sensibilidad en 15 y 60 min, respectivamente. Además, consideraron una hidrólisis positiva cuando los picos de masas de la molécula de ertapenem intacta [(M+H⁺), 476 m/z] y el de su sal monosódica [(M+Na⁺), 498 m/z] desaparecieron completamente. Por lo tanto, y dado que son los dos picos más importantes (Sparbier et al., 2012), se podría considerar que en nuestros ensayos también ha tenido lugar esta hidrólisis del ertapenem debido a la desaparición de dichos picos (Figura 6.7D). El protocolo utilizado ha sido similar al propuesto por Carvalhaes et al. (2013), con la diferencia de la solución de reacción empleada por estos autores que fue Tris/HCl 20 mM, pH 6.8. Por todo ello, el protocolo utilizado en este trabajo podría funcionar para la detección de carbapenemasas KPC con el equipo VITEK-MS, aunque se requieren más ensayos para mejorar la metodología, reducir el ruido de fondo obtenido en los espectros, así como optimizar la detección de las otras formas hidrolizadas que no se han manifestado.

La tecnología de MALDI-TOF ofrece grandes ventajas en la detección de resistencias antimicrobianas, entre las que se incluyen la sencillez, el ahorro de tiempo y dinero y la alta eficacia en la detección de bacilos gramnegativos (sensibilidad y especificidad del 98% y 100%, respectivamente) (Oviaño et al., 2016). Además, estos protocolos podrían establecerse como un método estandarizado y automatizado en

laboratorios clínicos, incluso para usuarios que no están familiarizados en técnicas de espectrometría de masas. Sin embargo, todavía hay ciertas limitaciones que solventar. En primer lugar, con este sistema de detección de la actividad enzimática sólo se determina la presencia de β -lactamasas y carbapenemasas, pero no se detectan problemas de permeabilidad de membrana, presencia de porinas, bombas de expulsión y otros posibles mecanismos de resistencia (Oviaño, 2019). Por otro lado, si la cantidad de bacteria presente en la preparación no es suficiente se pueden obtener falsos negativos (Ferreira et al., 2010), por lo que es importante estandarizar la preparación del inóculo. Asimismo, es necesario una configuración y optimización del equipo para obtener la suficiente resolución y sensibilidad y, por otro lado, aún no están disponibles en el mercado *kits* comerciales para la detección de β -lactamasas. En la actualidad solamente existe un *kit* para la detección de carbapenemasas (MBT STAR-Carba IVD, Bruker Daltonik) y sólo puede usarse en equipos MALDI Biotyper (Bruker Daltonik). A estas desventajas hay que sumar que el equipo VITEK-MS (bioMérieux) no incluye ninguna plataforma automatizada para la detección de resistencias, por lo que la comparación visual de los perfiles adquiridos requiere en este caso cierta experiencia en la interpretación de espectros de masas.

Finalmente, hay que señalar que en este estudio solamente se han utilizado dos cepas por cada tipo de BLEE, por lo que no sería correcto generalizar los resultados. Además, se han estudiado cepas que presentan un único tipo de BLEE, cuando existe la posibilidad de que una cepa pueda presentar más de un tipo de β -lactamasa. Asimismo, también se ha comprobado que distintos inhibidores de β -lactamasas y carbapenemasas como por ejemplo tazobactam, avibactam o ácido aminofenilborónico (APBA) pueden tener mayor o menor eficacia en la inactivación según el tipo de enzima presente, por lo

que sería necesario desarrollar un protocolo probando distintos inhibidores, que podría ayudar a la tipificación de las diferentes cepas BLEE/carbapenemasas.

En definitiva, queda mucho camino por investigar en relación a esta tecnología. Y aunque es posible que MALDI-TOF MS no sustituya a ninguna de las técnicas preexistentes para la detección de resistencia a los antimicrobianos (tal y como señala Oviaño, 2019), seguro que contribuirá a mejorar el diagnóstico clínico, aportando una información valiosa para definir el tratamiento correcto de forma rápida y a muy bajo coste.

Capítulo 7



Uso de péptidos derivados de la lactoferricina y de bacterias lácticas frente a *E. coli* productoras de BLEE.

Parte de los resultados de este capítulo han sido obtenidos en la estancia doctoral llevada a cabo en “University of Surrey, Department of Nutritional Sciences, School of Biosciences and Medicine”. Estancia financiada por la Fundación Caja Navarra, Obra social “la Caixa” y Universidad de Navarra.

1. Introducción

La ausencia de nuevos antimicrobianos y la progresiva expansión de bacterias multirresistentes está acelerando la búsqueda de compuestos alternativos a los antibióticos. Una de las apuestas en este sentido es el desarrollo de terapias antimicrobianas basadas en el uso de péptidos, en donde se incluyen los péptidos antimicrobianos (AMPs) (Gales et al., 2006). Se trata de pequeñas moléculas (12-100 aminoácidos), con carga neta positiva y naturaleza anfipática (Chan et al., 2005) y tienen especial interés ya que apenas se han reportado resistencias asociadas al uso de los mismos (Li et al., 2005). Son un componente muy importante en la primera línea de defensa del huésped frente a infecciones y constituyen un mecanismo de inmunidad innata que se ha conservado a lo largo de la evolución (Kang et al., 2012). Destacan las bacteriocinas y la polimixina (aisladas de microorganismos), la lebecina y melitina (aisladas de invertebrados), la miAMP1 y purotionina (aisladas de plantas) y la lactoferrina (aislada del ser humano) (Cederlund et al., 2011; Ammons and Copié, 2013).

Uno de los compuestos antimicrobianos más abundantes en el sistema inmune innato humano es la lactoferrina, también conocida como lactotransferrina. Esta glicoproteína globular de 80 kDa pertenece a la familia de las transferrinas y fue inicialmente purificada a partir de leche (Ammons and Copié, 2013). Su región funcional más importante es un péptido de 45 aminoácidos, denominado lactoferrina, que se encuentra en el extremo N-terminal, se obtiene por hidrólisis ácida y contiene la mayoría de las propiedades de la proteína nativa (Gifford et al., 2005). La lactoferrina posee varias funciones, que incluyen actividad antimicrobiana frente a bacterias, virus, hongos y parásitos (Siqueiros-Cendón et al., 2014), actividad permeabilizante (Sánchez-Gómez et al., 2011), antiendotóxica y actividad frente a la formación de *biofilm*

(Martinez de Tejada et al., 2012; Sánchez-Gómez et al., 2015). Debido a su carácter catiónico y su anfipaticidad, este péptido tiene la capacidad de unirse al LPS de la envoltura de bacterias Gram negativas y a los ácidos teicoicos de las Gram positivas, produciendo una alteración que conlleva a la desestabilización de la envoltura bacteriana. Esta desestabilización provoca la muerte directa del microorganismo o bien indirecta a través de la permeabilización de la membrana bacteriana a otros compuestos, como los antibióticos (Brouwer et al., 2011). Por ello, varios trabajos han intentado desarrollar tratamientos basados en péptidos derivados de la lactoferricina humana con acción bactericida (Haversen et al., 2000), acción antiviral (Andersen et al., 2003) o basados en la capacidad permeabilizante en combinación con otros antibióticos (Sánchez-Gómez, 2008).

El uso de bacteriocinas podría ser otra posible solución a la problemática de las resistencias a los antibióticos. Se trata de péptidos con actividad antimicrobiana segregados por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (López et al., 2008). Entre los microorganismos productores de bacteriocinas, las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido las más estudiadas, aunque de momento la única bacteriocina aplicada a nivel comercial con fines de conservación de alimentos es la nisina producida por *Lactococcus lactis* (Mondragón Preciado et al., 2013). De manera similar a la lactoferricina, el mecanismo de acción de estas bacteriocinas es la formación de canales o poros iónicos sobre la membrana celular, generando una desestabilización y permeabilización de ésta (Grande et al., 2005), dando lugar a la salida de distintos compuestos (fosfato, aminoácidos, ATP etc.), disminuyendo la síntesis de macromoléculas y por consecuencia, provocando la muerte del microorganismo (González-Martínez, 2003). Existe una gran variedad de tipos de bacteriocinas, que se clasifican según sus características bioquímicas y

genéticas (Kumariya et al., 2019). Entre ellas destacan los lassopéptidos, sactipéptidos o plantaricina.

Los lassopéptidos pertenecen a la clase emergente de péptidos sintetizados ribosómicamente y modificados postraduccionalmente (RiPP) (Arnison et al., 2013). Contienen un pliegue en forma de nudo, que les confiere una estabilidad y actividad relevante. Sin embargo, el mecanismo biosintético de estas moléculas sigue siendo en gran parte desconocido, aunque se conoce que requieren dos enzimas (B para procesamiento y C para ciclación) para ensamblar la estructura inusual en forma de nudo (Zhu et al., 2016). Dentro de esta clase también se enmarcan los sactipéptidos, que representan una especie de bacteriocinas con puentes de azufre. Se caracterizan por tener un patrón típico que comprende tres o cuatro residuos de cisteína separados por un número de aminoácidos (Flühe and Marahiel, 2013). Además, es particular la presencia de un puente tioéter que se forma entre una cisteína y el α -carbono de un aminoácido (Lohans et al., 2014). Este enlace es absolutamente necesario para la actividad antibiótica y se ha demostrado que las enzimas del dominio SAM/SPASM (S-adenosilmetionina) son responsable de la formación del mismo (Grove et al., 2017). Por último, las plantaricinas son péptidos antimicrobianos naturales producidos por cepas de *Lactobacillus plantarum*, que han recibido especial atención ya que tienen gran importancia como bioconservantes alimentarios y/o iniciadores en productos lácteos y productos cárnicos (Diep et al., 2009). También han sido utilizados para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias patógenas, así como para reducir los síntomas del síndrome del colon irritable o como para proteger contra las infecciones del tracto urinario (Abdulhussain Kareem and Razavi, 2020).

Por todo ello, el objetivo general que se persigue en este capítulo es evaluar la actividad de distintos AMPs frente a *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro

extendido (BLEE). Dado que los péptidos antimicrobianos desestabilizan y permeabilizan la envoltura bacteriana, se postula que el uso combinado de concentraciones subinhibitorias de péptidos derivados de la lactoferricina junto con un inhibidor de β -lactamasas y de un antibiótico, incrementa el efecto que tiene cada uno por separado, facilitando la penetración de estos compuestos al interior de las bacterias resistentes y dando lugar a la neutralización del mecanismo de resistencia. Por otro lado, el grupo de investigación de Gutiérrez-Merino (University of Surrey) ha realizado investigaciones previas con BAL aisladas de animales salvajes, demostrando tener actividad antibacteriana frente a *M. bovis* (Stedman et al., 2018, 2020). Por ello, se pretende analizar si tres cepas de bacterias ácido-lácticas (2 *E. faecalis* y 1 *L. plantarum*) aisladas de jabalíes y tejón son capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, gracias a la producción de bacteriocinas efectivas.

2. Material y métodos

2.1 Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE utilizadas se muestran en la Tabla 7.1. Para los ensayos con péptidos derivados de la lactoferrina se seleccionaron 5 cepas clínicas resistentes a Piperacilina/Tazobactam y sensibles a colistina (debido a que es una polimixina como el PMBN). De éstas, tres pertenecían a complejos clonales (CC) y secuencias tipo (ST) de interés como 131CC y 23CC (Capítulo 2), mientras que las otros dos pertenecían a otros complejos asociados con los filogrupos B1 y D (este último relacionado con cepas más virulentas). En cuanto a los ensayos con péptidos producidos por bacterias ácido-lácticas, además de utilizar la cepa clínica C58, se seleccionó una cepa ambiental aislada de un río (A8), productora de β -lactamasas del tipo CTXM-15 y asociada con el complejo 23CC.

A partir del conjunto de cepas mantenido en congelación (-135°C) se prepararon las cepas de trabajo mediante siembra en medios generales (TSA; Scharlau, Sentmenat, Barcelona) e incubación a 37°C durante 24 h. Éstas se mantuvieron en refrigeración (5°C \pm 3°C), realizando pases periódicos a medios frescos para los diferentes ensayos (incubación a 37°C durante 24 h). Además, como control se utilizó una cepa de *E. coli* no productora de BLEE, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (*E. coli* CECT 1978, ATCC 25922).

Tabla 7.1. Principales características de las cepas empleadas en el estudio de actividad de AMP

N° cepa	Código	Origen	β-lactamasa	Filogrupo	ST	CC	Perfil de resistencia a antibióticos ¹						
							Penicilinas	Cefalosporinas	Monobactams	Inhibidores β-lactamasas	Quinolonas	Tetracilinas	Otros
1	C33	Clínico	CTX-M15, OXA-1	B2	ST3213	131CC	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	LV, CIP, MXF	TET	SXT
2	C58	Clínico	CTX-M15, OXA-1	B2	ST3878	131CC	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	LV, CIP, MXF	TET	SXT
3	C62	Clínico	CTX-M14, TEM-1	A	ST410	23CC	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX	AZT	AMC, AMS, TZP	-	-	FOT
4	C70	Clínico	CTX-M15, OXA-1	B1	ST94	448CC	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	LV, CIP, MXF	TET	SXT, CHL
5	C107	Clínico	CTXM-M14, CTX-M15	D	ST4849	NA ²	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP	AZT	AMC, AMS, TZP	LV, CIP, MXF	TET	SXT, CHL
6	A8	Río	CTXM-M15	C	ST410	23CC	AMP, PIP, MZ	CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FOX, FEP	AZT	AMC, AMS	LV, CIP, MXF, NOR	TET, TIG	SXT, CHL

¹AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; MZ, mezlocilina; CZ, cefazolina; CXM, cefuroxima; CPD, cefpodoxima, CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima, FOX, cefoxitina; FEP, cefepime; AZT, aztreonam; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; AMS, ampicilina-sulbactam; TZP, piperacilina-tazobactam; ETP, ertapenem; MER, meropenem; IMP, imipenem; GM, gentamicin; TO, tobramicina; LV, levofloxacin; CIP, ciprofloxacino; MXF, moxifloxacino; NOR, norfloxacino, TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; FOT, fosfomicina; CHL, cloranfenicol, COL, colistina.

² NA: no asociado

2.2. Productos antimicrobianos: antibióticos, inhibidores de β -lactamasas y péptidos

El antibiótico amoxicilina y el inhibidor de β -lactamasas (ácido clavulánico), fueron suministrados por Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Los productos en su forma liofilizada se conservaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se prepararon distintas soluciones en H₂O desionizada Tipo II (Wasserlab, Noáin, España) y se conservaron a -20°C.

Los péptidos usados en este estudio (Tabla 7.2) se seleccionaron por ser los que presentaron mayor actividad permeabilizante en investigaciones previas (Sánchez-Gómez, 2008; Ferrer-Espada, 2016). Los péptidos de la generación P2 fueron suministrados por NEO Multiple Peptide Systems (NEOMPS; San Diego, EEUU), que fueron sintetizados por el método de síntesis en fase sólida de Merrifield y purificados por RP-HPLC (Sánchez-Gómez, 2008). A su vez, los péptidos de las generaciones P4 y P5 fueron suministrados por PolyPeptide Laboratories (Estrasburgo, Francia) con una pureza mayor del 95% y con un grupo amida en vez del carboxilo terminal. Como péptido modelo de actividad permeabilizante, se empleó el nonapéptido derivado de la polimixina B (PMBN) (Sigma).

Tabla 7.2. Secuencias de los péptidos utilizados en el estudio de actividad de AMP

Péptidos	Secuencias
P2-15	F W R I R I R R -NH ₂
P2-22	F W R R N F W R R - NH ₂
P4-1	P F W R R F W R R R - NH ₂
P5-4	F W R I W R W R R R - NH ₂

Todos los péptidos se resuspendieron en H₂O desionizada Tipo II a una concentración de 10 mg/ml y se conservaron a -20°C para su posterior uso.

2.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para cuantificar la actividad antimicrobiana de los distintos compuestos sobre las cepas, se determinó la CMI según el método de microdilución en caldo de acuerdo con las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Se empleó el medio de cultivo Mueller Hinton con cationes ajustados (MH, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia) y placas de 96 pocillos de microtitulación con fondo en U.

A partir de un pase fresco de las cepas a ensayar en agar TSA (24 h, 37°C), se ajustó el inóculo a 0,5 en la escala de McFarland en una solución salina (APT, Scharlau) y posterior dilución 1/100 en caldo MH (aprox. $1,5 \times 10^6$ UFC/ml). A cada pocillo se añadieron 100 μ l de caldo MH estéril y en el primer pocillo se añadió 100 μ l de la solución de antimicrobiano y se realizaron diluciones dobles seriadas. A continuación, se añadieron 100 μ l del inóculo preparado (concentración inicial en cada pocillo en torno a $1,5 \times 10^5$ UFC/ml). Cada una de las concentraciones se testó por triplicado. Las dos últimas columnas correspondieron a los controles negativo (200 μ l de caldo MH) y positivo (100 μ l caldo MH + 100 μ l inóculo). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y posteriormente se procedió a realizar la lectura visual de los resultados. La CMI se definió como la concentración más baja de antimicrobiano que impedía la aparición de turbidez o la presencia de un depósito bacteriano (botón) en los pocillos.

2.4. Estudios de sinergia (*Checkerboard*)

2.4.1. Combinaciones de dos compuestos

Para estudiar la existencia de actividad sinérgica entre dos compuestos, se utilizó el método del tablero o *Checkerboard test* (Eliopoulos and Moellering, 1982), realizado en placas de 96 pocillos y empleando el medio de cultivo MH con cationes ajustados (Becton Dickinson). En estos ensayos se combinaron antibióticos con el inhibidor de β -lactamasas (ácido clavulánico) o antibióticos con péptidos antimicrobianos y se evaluó

la capacidad de estas combinaciones para inhibir el crecimiento de la cepa bacteriana *E. coli* C58 (Tabla 7.1). Este método se fundamenta en el hecho de que se genera un gradiente antimicrobiano horizontal (de izquierda a derecha de la placa) y un segundo gradiente de otro compuesto en vertical (de arriba hacia abajo), de modo que se obtienen combinaciones de ambos productos en distintas concentraciones (Figura 7.1). Los rangos de concentraciones de los antimicrobianos se seleccionaron sobre la base de sus CMIs.

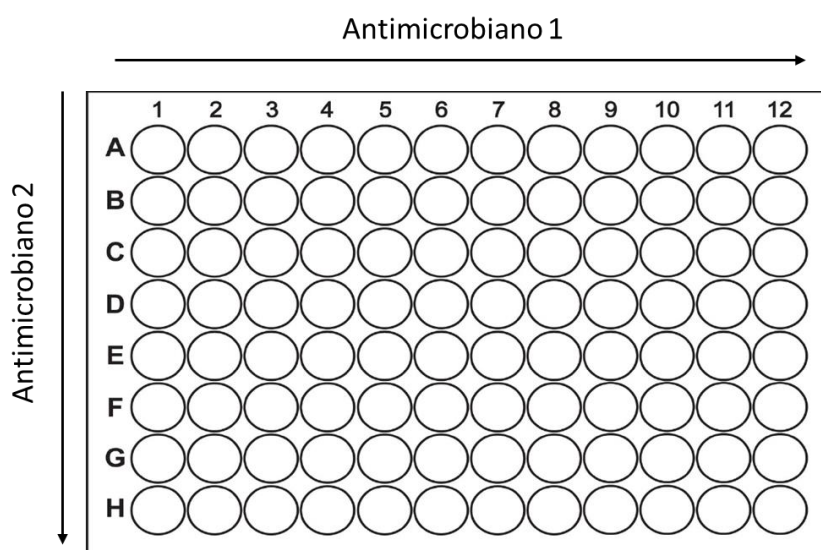


Figura 7.1. Esquema del método *Checkerboard* de dos compuestos. Las concentraciones de cada antimicrobiano disminuyen en la dirección de la flecha.

Para cuantificar la actividad sinérgica de los dos compuestos combinados se empleó el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada (ICIF). Este índice relaciona la CMI del antimicrobiano 1 con la del antimicrobiano 2, solos y en combinación, mediante la siguiente fórmula:

$$ICIF = \left(\frac{\text{CMI antimicrobiano 1 en la combinación}}{\text{CMI antimicrobiano 1}} \right) + \left(\frac{\text{CMI antimicrobiano 2 en la combinación}}{\text{CMI antimicrobiano 2}} \right)$$

Los valores del índice ICIF se interpretaron de acuerdo a lo reportado por otros autores (Pompilio et al., 2012; Bugli et al., 2013):

- ICIF \leq 0,5: efecto sinérgico

- ICIF entre 0,5 y 2: efecto aditivo o indiferente
- ICIF > 2: efecto antagónico

En los casos en los que no se pudo determinar la CMI del antimicrobiano (no se produjo inhibición con ninguna de las concentraciones ensayadas), para el cálculo del ICIF se tomó el valor de la dilución inmediatamente superior a la más alta ensayada.

2.4.2. Combinaciones de tres compuestos

Para evaluar la capacidad permeabilizante de los péptidos antimicrobianos, se empleó la técnica descrita en el apartado anterior, empleando una concentración constante de uno de los tres componentes (en concreto, el inhibidor de β -lactamasas). Para ello se realizaron diluciones dobles seriadas horizontales del antibiótico, diluciones dobles seriadas verticales del péptido y se empleó una única concentración del inhibidor ácido clavulánico (1 μ g/ml).

La actividad sinérgica de las combinaciones triples se calculó añadiendo una fracción adicional a la fórmula descrita en el apartado 2.4.1 (Berenbaum, 1978):

$$ICIF = \left(\frac{\text{CMI A en combinación}}{\text{CMI A}} \right) + \left(\frac{\text{CMI B en combinación}}{\text{CMI B}} \right) + \left(\frac{\text{CMI C en combinación}}{\text{CMI C}} \right)$$

A= antimicrobiano 1, B= antimicrobiano 2, C= antimicrobiano 3.

2.5. Aislados de bacterias ácido-lácticas (BAL)

El aislamiento y secuenciación del genoma completo de las tres bacterias ácido lácticas (BAL) utilizadas en este trabajo, fue realizado con anterioridad por el grupo del Dr. Gutiérrez-Merino de la Universidad de Surrey (Reino Unido) (Stedman et al., 2018, 2020). Dado que no son resultados propios de esta investigación, se resumen a continuación las características de dichas cepas.

Se utilizaron 2 cepas de *Enterococcus faecalis*, denominadas C34 y A1, aisladas de un tejón y de un jabalí, respectivamente. La secuenciación del genoma completo

determinó la presencia de clústeres genéticos asociados con la producción de bacteriocinas. La cepa C34 presentaba un clúster compatible con un lassopeptido, mientras que el de la cepa A1 correspondía con un sactipeptido (Figura 7.2).

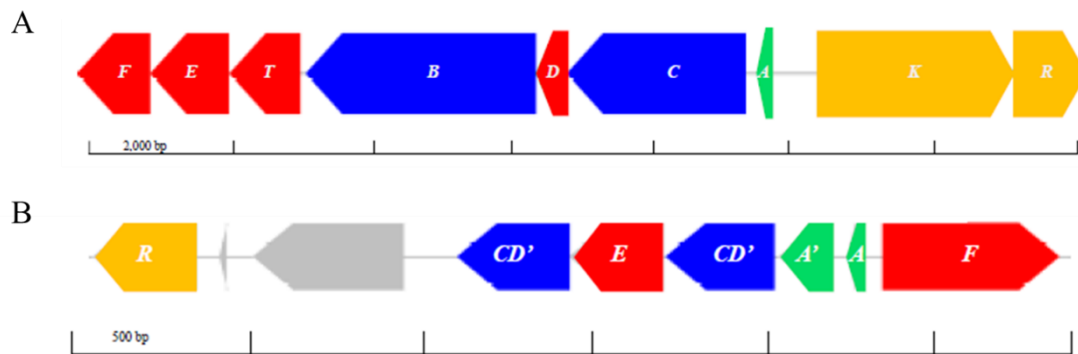


Figura 7.2. Clústeres genéticos de *E. faecalis* C34 (A) y *E. faecalis* A1 (B). Verde: péptido precursor; azul: enzimas asociadas con la modificación postraduccional; rojo: proteínas para transporte o inmunidad; amarillo: genes reguladores y gris: otras proteínas hipotéticas.

La tercera cepa utilizada fue un *Lactobacillus plantarum* denominado C1, aislado de un jabalí y que presentaba un clúster genético compatible con el péptido



plantaricina (Figura 7.3)

Figura 7.3. Clúster genético de *Lactobacillus plantarum* C1. Los genes indicados en rojo comprenden el operón *plnWVUTSHG*, que participa en el transporte, procesamiento y autoprotección, mientras que los genes *plnE* (verde) y *plnF* (azul) codifican los péptidos plnE y plnF.

2.6. Cultivo de BAL y extracción de sobrenadantes

Las distintas BAL fueron cultivadas en agar o caldo MRS (Oxoid) e incubadas a 37°C durante 24 h. Para la extracción de las bacteriocinas presentes en los caldos incubados, se centrifugó a 12.000 X g durante 5 min (Fisher Micro Centrifuge Model 235A). Posteriormente, se pasó el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 micras

(Millipore, Tullagreen, Ireland). Este extracto se utilizó en los correspondientes ensayos el mismo día de su obtención (conservación a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$).

2.7. Antibiógramas

A partir del conjunto de cepas mantenido en congelación, se prepararon las cepas de trabajo (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* C58 y *E. coli* A8) mediante siembra en medios generales (TSA; Scharlau) e incubación a 37°C durante 24 h. A partir de estos cultivos frescos, se prepararon inóculos en caldo peptona (APT; Scharlau) ajustando la concentración en densitómetro (DEN-1-BIOSAN) a 0,5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Los antibiógramas se realizaron de dos maneras diferentes. Por un lado, se siguió el método tradicional de difusión en agar (*disk diffusion test*) (Bauer et al., 1966), con la variante de colocar el producto de ensayo en pocillos. Tras extender el inóculo con un hisopo en todas las direcciones de la superficie de una placa de Mueller Hinton II con cationes ajustados (MH, Becton Dickinson), se practicaron pocillos en el agar y se añadió 50 μl del sobrenadante extraído anteriormente. Como controles positivos de inhibición se utilizaron discos de Ampicilina 10 μg (AMP) suministrados por Becton Dickinson. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y finalmente se midió el diámetro de los halos de inhibición generados.

Por otro lado, se utilizó la metodología conocida como *agar spot assay* (Fijan, 2016). Se prepararon cultivos frescos de las BAL en caldo MRS y se añadieron 5 μl de dichos cultivos a una placa de MRS agar (forma de “gota”). Tras incubar las placas a 37°C durante 24 h, se cubrió la superficie del agar MRS con 20 ml de medio de cultivo MH fundido que contenía el inóculo ajustado de la cepa de *E. coli*, que tras enfriar solidificó sobre la superficie inoculada con los cultivos BAL. De nuevo se incubaron las

placas a la misma temperatura y al día siguiente se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición generados.

2.8. Análisis de la viabilidad celular de *E. coli* en co-cultivo con BAL

Se realizaron co-cultivos de una cepa de *E. coli* que contenía un plásmido que codifica la proteína verde fluorescente GFP, junto con las distintas BAL. Esta cepa fue amablemente donada por el Dr. Jose Jimenez y pertenece a la colección de plásmidos de la “School of Biosciences and Medicine, Universidad de Surrey”. En primer lugar, se realizaron cultivos individuales de *E. coli*-GFP en 15 ml TSB y de BAL en 15 ml de caldo MRS. Pasadas 24 h de incubación a 37°C, se añadió 15 µl del cultivo de *E. coli*-GFP y 15 µl del cultivo de BAL a un tubo con 15 ml de TSB, que se incubó en agitación a 250 rpm durante 24 h a 37°C. A continuación, se añadió 1 ml de los distintos co-cultivos a placas de microtiter de 24 pocillos (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) y se empleó el equipo CLARIOstar Plus (BMG Labtech) para realizar una monitorización de la viabilidad de la cepa de *E. coli*-GFP en función de la fluorescencia emitida a 600 nm. Se añadieron los controles positivos correspondientes (BAL en MRS y *E. coli*-GFP en TSB), así como un control negativo (TSB).

De la misma manera, se llevaron a cabo co-cultivos utilizando la cepa de *E. coli* ATCC 25922 y se realizaron recuentos bacterianos de los mismos, en placas de Chromocult (Scharlau) (37°C, 24 h) para comprobar si se producía una reducción de la viabilidad celular de esta cepa en presencia de las distintas BAL.

2.9. Curvas de crecimiento de *E. coli* en presencia de extractos de monocultivos o co-cultivos de BAL

Se realizaron curvas de crecimiento de las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* C58 en presencia de los sobrenadantes de los distintos monocultivos o co-cultivos con

las BAL, utilizando el equipo automatizado Bioscreen C (Lab Systems). Se llevaron a cabo tres estrategias (Figura 7.4):

- Estrategia 1: evaluación de la actividad de los sobrenadantes de los monocultivos de BAL frente a cepas de *E. coli* (A).
- Estrategia 2: estudio de los sobrenadantes de los distintos co-cultivos para confirmar si la presencia de células de *E. coli* vivas activa la producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas y/u otros metabolitos (B).
- Estrategia 3: determinar si los metabolitos de *E. coli* son los que activan a las BAL a llevar a cabo una producción eficaz de estos péptidos antimicrobianos (C).

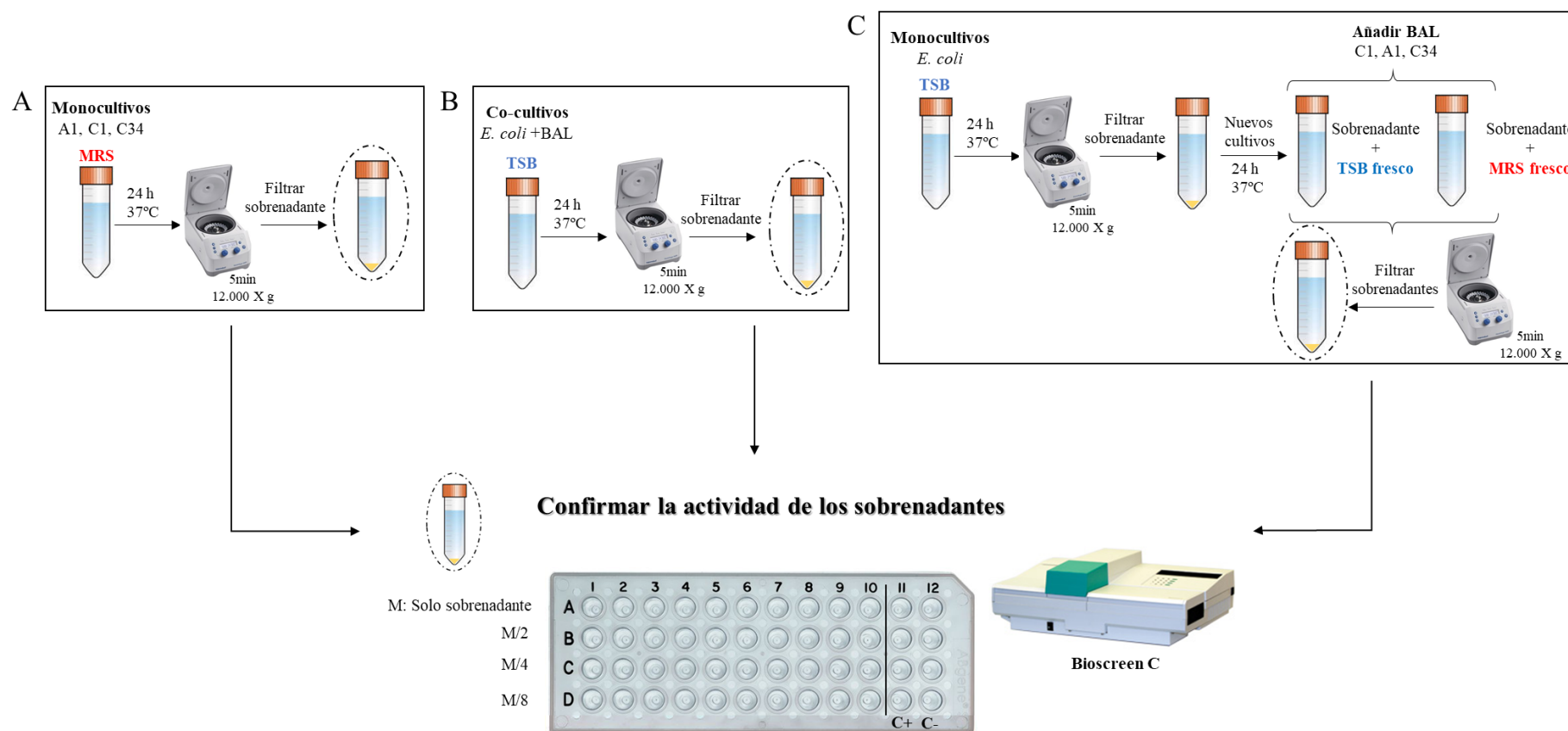


Figura 7.4. Representación esquemática de las tres estrategias llevadas a cabo en estos ensayos. **A)** estrategia 1, para confirmar la actividad producida por los sobrenadantes de monocultivos de BAL; **B)** estrategia 2, para confirmar la actividad producida por los sobrenadantes de los distintos co-cultivos y **C)** estrategia 3, para determinar si los metabolitos de monocultivos de *E. coli* activan la producción de estos péptidos antimicrobianos

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. En el primer pocillo se añadieron 200 μ l del sobrenadante (extraído siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.6) y se realizaron diluciones dobles seriadas en 100 μ l TSB. El inóculo de *E. coli* se ajustó en caldo peptona (APT; Scharlau) a 0,5 McFarland en el densitómetro (DEN-1-BIOSAN) y se realizó una dilución 1/100 en caldo TSB, para lograr una concentración aproximada de $1,5 \times 10^6$ UFC/ml. Se añadió 100 μ l de este inóculo a todos los pocillos (concentración inicial en cada pocillo en torno a $1,5 \times 10^5$ UFC/ml) y se establecieron las condiciones del ensayo: incubación 37°C durante 24 h con agitación constante y lectura cada 30 minutos ($DO_{420-580 \text{ nm}}$). Los sobrenadantes se estudiaron por triplicado y se añadieron controles negativos (200 μ l de caldo TSB) y positivos (100 μ l caldo TSB + 100 μ l inóculo).

3. Resultados

3.1. Determinación de la CMI de los péptidos antimicrobianos y selección de cepa

La Tabla 7.3 muestra los resultados de la CMI de los distintos péptidos derivados de la lactoferrina y del PMBN para las cepas C33, C58, C62, C70 y C107.

Tabla 7.3. CMI de péptidos frente a distintas cepas de *E. coli* productoras de BLEE

Cepas	CMI Péptidos ($\mu\text{g/ml}$)				
	P2-15	P2-22	P4-1	P5-4	PMBN
C33	8	128	32	4	512
C58	4	128	4	2	512
C62	16	256	64	32	512
C70	4	128	16	2	512
C107	8	128	16	8	512

La CMI para el péptido PMBN fue la esperada, debido a su bajo poder bactericida frente a cepas productoras de BLEEs (Brown and Dawson, 2015). De la misma manera, las CMIs del péptido P2-22 fueron elevadas frente a todas las cepas, por lo que se descartó este péptido para posteriores ensayos. Por otro lado, la cepa C62 fue resistente a la acción de estos péptidos derivados de la lactoferrina, mientras que la cepa C58 fue la más sensible.

Por tanto, según estos resultados y los obtenidos en ensayos previos por otros autores (Sánchez-Gómez, 2008; Razquin-Olazarán, 2012; Ferrer-Espada, 2016) que confirmaron la capacidad permeabilizante de P2-15 y P4-1, se seleccionó la cepa C58 y ambos péptidos para los siguientes experimentos de potenciación antibiótica.

3.2. Estudios de sinergia con los péptidos derivados de la lactoferrina

Los ensayos preliminares con la cepa C58 determinaron unos valores de CMI $>512 \mu\text{g/ml}$ para la amoxicilina y de $16 \mu\text{g/ml}$ para el ácido clavulánico. Posteriormente, el ensayo de *checkerboard* demostró actividad sinérgica entre ambos

compuestos (ICIF=0,18), incluso con la concentración más baja ensayada de ácido clavulánico (1 µg/ml) (Figura 7.5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	16 512	16 256	16 128	16 64	16 32	16 16	16 8	16 4	16 2	16 1	
B	8 512	8 256	8 128	8 64	8 32	8 16	8 8	8 4	8 2	8 1	ICIF= 0,5
C	4 512	4 256	4 128	4 64	4 32	4 16	4 8	4 4	4 2	4 1	ICIF= 0,26
D	2 512	2 256	2 128	2 64	2 32	2 16	2 8	2 4	2 2	2 1	ICIF= 0,18
E	1 512	1 256	1 128	1 64	1 32	1 16	1 8	1 4	1 2	1 1	ICIF= 0,18

Figura 7.5. Representación esquemática del ensayo *checkerboard* entre amoxicilina y ácido clavulánico. Rojo: amoxicilina (µg/ml), azul: ácido clavulánico (µg/ml). Casillas sombreadas: crecimiento bacteriano. ICIF: Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada. En cada fila, los valores de MIC rodeados por un círculo fueron los empleados para el cálculo de la ICIF. Los valores de ICIF inferiores a 0,5 son indicativos de sinergia

3.2.1. Estudios de sinergia con el péptido P4-1

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo para evaluar la sinergia entre amoxicilina y el péptido derivado de la lactoferrina P4-1. Aunque se consiguió disminuir la CMI de la amoxicilina hasta 128 µg/ml (datos no mostrados), no se obtuvo efecto sinérgico entre ambos compuestos (índices ICIF > 0,5). Además, esta reducción de la CMI se situó en valores alejados del umbral de sensibilidad (≤ 8 µg/ml CLSI). Por ello, se llevó a cabo un ensayo *checkerboard* entre amoxicilina, P4-1 y ácido clavulánico, utilizando una concentración fija de este inhibidor de β -lactamasas (1 µg/ml, la concentración más baja que había mostrado actividad en el ensayo anterior). En este caso, los valores de ICIF también fueron mayores de 0,5 (Figura 7.6), a excepción de las dos últimas filas (C y D) en donde la CMI de amoxicilina se redujo solamente hasta 128 µg/ml.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	4 512 1	4 256 1	4 128 1	4 64 1	4 32 1	4 16 1	4 8 1	4 4 1	4 2 1	4 1 1	ICIF= 1
B	2 512 1	2 256 1	2 128 1	2 64 1	2 32 1	2 16 1	2 8 1	2 4 1	2 2 1	2 1 1	ICIF= 0,7
C	1 512 1	1 256 1	1 128 1	1 64 1	1 32 1	1 16 1	1 8 1	1 4 1	1 2 1	1 1 1	ICIF= 0,4
D	0.5 512 1	0.5 256 1	0.5 128 1	0.5 64 1	0.5 32 1	0.5 16 1	0.5 8 1	0.5 4 1	0.5 2 1	0.5 1 1	ICIF= 0,3

Figura 7.6. Representación esquemática del ensayo *checkerboard* entre amoxicilina, ácido clavulánico y P4-1. Rojo: amoxicilina (µg/ml), verde: P4-1 (µg/ml) y negro: ácido clavulánico (µg/ml). Casillas sombreadas: crecimiento bacteriano. ICIF: Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada. En cada fila, los valores de MIC rodeados por un círculo fueron los empleados para el cálculo de la ICIF. Los valores de ICIF inferiores a 0,5 son indicativos de sinergia.

La Tabla 7.4 resume los resultados obtenidos en estos ensayos con el péptido P4-1, en donde se puede observar que, en definitiva, el empleo de concentraciones subinhibitorias del péptido P4-1 no ha conseguido sensibilizar a la cepa C58 a la amoxicilina.

Tabla 7.4. Resultados de CMI de la cepa *E. coli* C58 en los estudios de *checkerboard* con el péptido P4-1.

P4-1 (µg/ml)	CMI de amoxicilina (µg/ml) en presencia de la concentración de ácido clavulánico indicada		ICIF
	0	1 µg/ml	
0	>512	128	-
0,5	>512	128	0,3
1	>512	128	0,4
2	>512	128	0,7
4	512	64	1

3.2.2. Estudios de sinergia con el péptido P2-15

El ensayo *checkerboard* para evaluar la sinergia entre amoxicilina y el péptido P2-15 mostró una reducción de la CMI de la amoxicilina hasta 32 µg/ml, pero los índices ICIF fueron mayores de 0,5. Como esta reducción de la CMI no fue suficiente para sensibilizar la cepa a este antibiótico β-lactámico, se realizó un nuevo ensayo en combinación de tres compuestos (amoxicilina, ac. clavulánico y P2-15).

En la Figura 7.7 se puede observar que la CMI fue capaz de reducirse hasta 32 µg/ml (casilla A5), pero el índice ICIF=1 lo que es indicativo de un efecto aditivo o indiferente. En las dos últimas filas (C y D), este índice indicó sinergia, pero la CMI de amoxicilina se redujo solamente hasta 64 µg/ml.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	4 512 1	4 256 1	4 128 1	4 64 1	4 32 1	4 16 1	4 8 1	4 4 1	4 2 1	4 1 1	ICIF= 1
B	2 512 1	2 256 1	2 128 1	2 64 1	2 32 1	2 16 1	2 8 1	2 4 1	2 2 1	2 1 1	ICIF= 0,6
C	1 512 1	1 256 1	1 128 1	1 64 1	1 32 1	1 16 1	1 8 1	1 4 1	1 2 1	1 1 1	ICIF= 0,4
D	0.5 512 1	0.5 256 1	0.5 128 1	0.5 64 1	0.5 32 1	0.5 16 1	0.5 8 1	0.5 4 1	0.5 2 1	0.5 1 1	ICIF= 0,2

Figura 7.7. Representación esquemática del ensayo *checkerboard* entre amoxicilina, ac. clavulánico y P2-15. Rojo: amoxicilina (µg/ml), verde: P2-15 (µg/ml) y negro: ac. clavulánico (µg/ml). Casillas sombreadas: crecimiento bacteriano. ICIF: Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada. En cada fila, los valores de MIC rodeados por un círculo fueron los empleados para el cálculo de la ICIF. Los valores de ICIF inferiores a 0,5 son indicativos de sinergia

La Tabla 7.5 resume los resultados obtenidos en estos ensayos con el péptido P2-15, en donde se puede ver que al igual que en el caso anterior con el péptido P4-1, el empleo de concentraciones subinhibitorias del péptido no ha conseguido sensibilizar a la cepa C58 a la amoxicilina.

Tabla 7.5. Resultados de CMI de la cepa *E. coli* C58 en los estudios de *checkerboard* con el péptido P2-15

P2-15 (µg/ml)	CMI de amoxicilina (µg/ml) en presencia de la concentración de ácido clavulánico indicada:		ICIF
	0	1 µg/ml	
0	>512	128	-
0,5	>512	64	0,2
1	>512	64	0,4
2	512	64	0,6
4	512	32	1

3.3. Estudios de sinergia con el péptido PMBN

Finalmente, se empleó el nonapéptido derivado de la polimixina B (PMBN) como péptido modelo de actividad permeabilizante. El ensayo de sinergia entre amoxicilina y PMBN consiguió disminuir la CMI de la amoxicilina únicamente hasta 256 µg/ml, observándose un índice ICIF de 0,26. Dicha mejora fue clínicamente irrelevante, ya que la adición del PMBN redujo la CMI de amoxicilina a valores alejados del umbral de sensibilidad (≤ 8 µg/ml CLSI) (datos no mostrados).

Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo *checkerboard* entre amoxicilina, PMBN y ácido clavulánico (1 µg/ml). Como se puede observar en la Figura 7.8, los valores de ICIF fueron menores de 0,5 obteniéndose sinergia en todas las concentraciones ensayadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	16 512 1	16 256 1	16 128 1	16 64 1	16 32 1	16 16 1	16 8 1	16 4 1	16 2 1	16 1 1	ICIF= 0,08
B	8 512 1	8 256 1	8 128 1	8 64 1	8 32 1	8 16 1	8 8 1	8 4 1	8 2 1	8 1 1	ICIF= 0,08
C	4 512 1	4 256 1	4 128 1	4 64 1	4 32 1	4 16 1	4 8 1	4 4 1	4 2 1	4 1 1	ICIF= 0,08
D	2 512 1	2 256 1	2 128 1	2 64 1	2 32 1	2 16 1	2 8 1	2 4 1	2 2 1	2 1 1	ICIF= 0,10
E	1 512 1	1 256 1	1 128 1	1 64 1	1 32 1	1 16 1	1 8 1	1 4 1	1 2 1	1 1 1	ICIF= 0,12
F	0.5 512 1	0.5 256 1	0.5 128 1	0.5 64 1	0.5 32 1	0.5 16 1	0.5 8 1	0.5 4 1	0.5 2 1	0.5 1 1	ICIF= 0,12

Figura 7.8. Representación esquemática del ensayo *checkerboard* entre amoxicilina, ácido clavulánico y PMBN. Rojo: amoxicilina (µg/ml), verde: PMBN (µg/ml) y negro: ácido clavulánico (µg/ml). Casillas sombreadas: crecimiento bacteriano. ICIF: Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada. En cada fila, los valores de MIC rodeados por un círculo fueron los empleados para el cálculo de la ICIF. Los valores de ICIF inferiores a 0,5 son indicativos de sinergia

De esta manera, a diferencia de los casos anteriores con los péptidos derivados de la lactoferricina, se ha conseguido sensibilizar a la cepa C58 a la amoxicilina ($S \leq 8$ µg/ml, CLSI) (Tabla 7.6). La potenciación de la actividad antibiótica mediada por

PMBN se ha producido de una manera dependiente a la dosis, ya que ésta ocurrió a las concentraciones más altas de PMBN analizadas (8-16 µg/ml). Es importante destacar que esta mejora es estrictamente dependiente de la actividad del inhibidor de β-lactamasas, ya que la adición de PMBN tenía un efecto menor en ausencia de ácido clavulánico.

Tabla 7.6. Resultados de CMI de la cepa *E. coli* C58 en los estudios de *checkerboard* con el péptido PMBN

PMBN (µg/ml)	CMI de amoxicilina (µg/ml) en presencia de la concentración de ácido clavulánico indicada		ICIF
	0	1 µg/ml	
0	>512	128	-
0,5	>512	64	0,12
1	>512	64	0,12
2	512	32	0,10
4	512	16	0,08
8	256	8	0,08
16	256	4	0,08

Filas sombreadas: combinaciones que consiguen sensibilizar a la cepa

3.4. Antibiogramas

Los resultados obtenidos con los distintos sobrenadantes de BAL frente a *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* C58 y *E. coli* A8 en el ensayo de difusión en agar se muestran en la Tabla 7.7. El sobrenadante C1 presentó actividad antimicrobiana frente a las tres cepas, observándose halos de inhibición con unos diámetros que oscilaron entre 10-13 mm. Igualmente, los sobrenadantes de las cepas A1 y C34 originaron halos de inhibición frente a ambas cepas productoras de BLEE, pero el diámetro fue menor. Además, los halos obtenidos frente a *E. coli* ATCC 29522 con ambos sobrenadantes fueron dudosos (Figura 7.9).

Tabla 7.7. Halos de inhibición producidos por los sobrenadantes de C1, A1, C34 y antibiótico control (diámetro en mm) en el ensayo de difusión en agar.

Cepa	Sobrenadantes ¹			Antibiótico control (AMP) ²
	C1	A1	C34	
<i>E. coli</i> ATCC 29522	10	*	*	20
<i>E. coli</i> C58	12	+	+	6
<i>E. coli</i> A8	13	+	+	6

¹*: Dudoso, +: halo de inhibición mínimo

²Valor 6 significa ausencia de halo (6 mm es el diámetro del pocillo); AMP, Ampicilina.

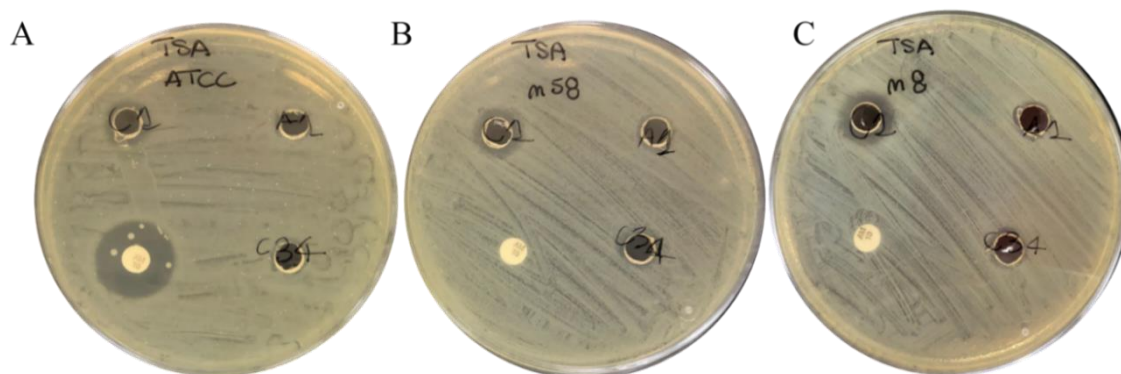


Figura 7.9. Antibiógramas de los sobrenadantes de C1, A1 y C34 frente a *E. coli* ATCC 29522 (A), *E. coli* C58 (B) y *E. coli* A8 (C).

En definitiva, parece que los sobrenadantes obtenidos a partir de los monocultivos de las cepas lácticas C1, A1 y C34, presentan actividad antimicrobiana frente a cepas productoras de BLEE. Para corroborar el débil resultado observado en las cepas A1 y C34, se llevó a cabo el ensayo de *agar spot assay*, enfrentando cultivos vivos de *E. coli* y las BAL. Los resultados confirmaron la actividad antimicrobiana producida por las tres cepas lácticas, observándose una mayor actividad con *L. plantarum* C1, que generó halos de inhibición de 25 mm, mientras que los halos producidos por A1 y C34 oscilaron entre 15-17 mm (Tabla 7.8 y Figura 7.10)

Tabla 7.8. Halos de inhibición producidos por las cepas vivas C1, A1, C34 con la metodología *agar spot assay* (diámetro en mm).

Cepas <i>E. coli</i>	Cepas BAL		
	C1	A1	C34
<i>E. coli</i> ATCC 29522	25	16	16
<i>E. coli</i> C58	25	17	16
<i>E. coli</i> A8	25	15	16

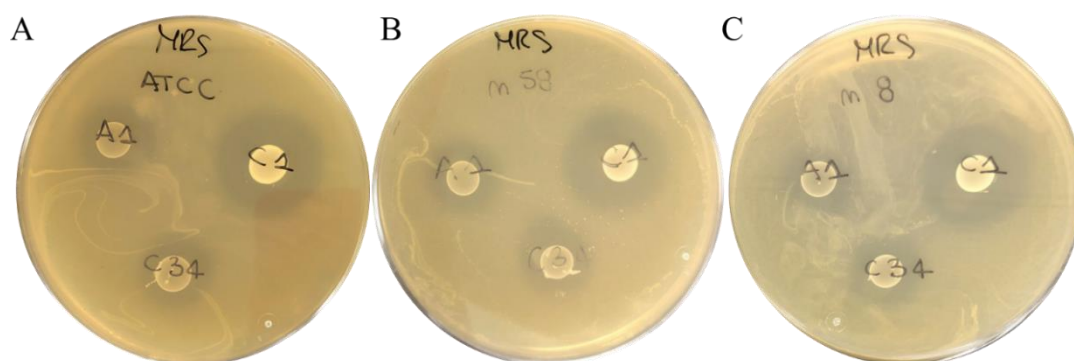


Figura 7.10. Antibiogramas realizados mediante la metodología *agar spot assay*, con las cepas vivas C1, A1 y C34, para evaluar la inhibición de *E. coli* ATCC 29522 (A), *E. coli* C58 (B) y *E. coli* A8 (C).

3.5. Reducción de la viabilidad celular de *E. coli* en co-cultivo con las BAL

Tras observar en el ensayo anterior la actividad antimicrobiana producida por las tres BAL vivas frente a distintas cepas de *E. coli*, se realizó una monitorización de la viabilidad bacteriana realizando un co-cultivo de ambas cepas y utilizando un lector de fluorescencia. Para ello se empleó una cepa de *E. coli* que contenía la proteína verde fluorescente GFP (*E. coli*-GFP).

Los resultados mostraron que estos tres aislados de BAL reducen la viabilidad celular de *E. coli*, observándose una disminución de la fluorescencia y un retraso en la fase de crecimiento en los tres co-cultivos (GFP-C34, GFP-C1 y GFP-A1) en comparación con el control positivo (*E. coli*-GFP). Como era de esperar, los tres monocultivos de BAL que actuaban como controles, no emitieron fluorescencia (Figura 7.11).

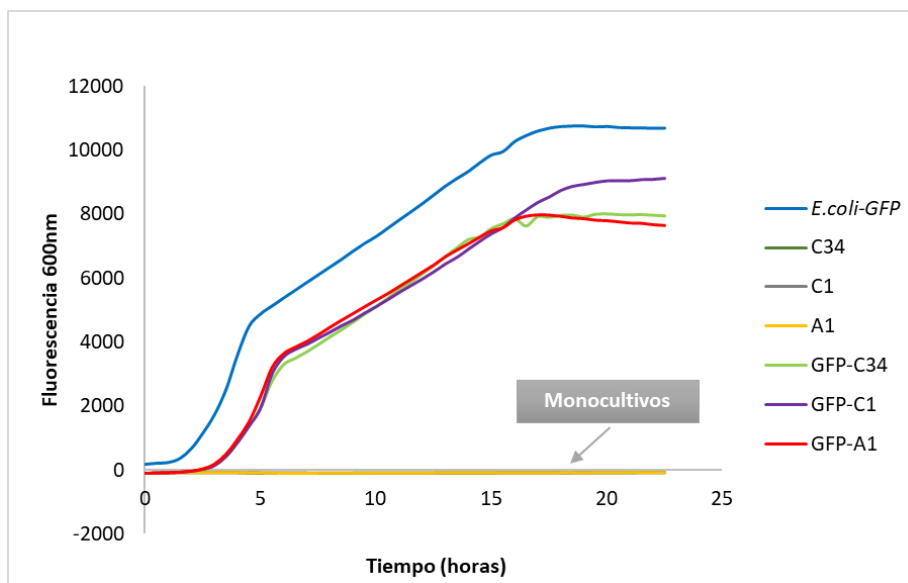


Figura 7.11. Curva de fluorescencia del co-cultivo entre *E. coli-GFP* y las BAL.

De igual forma, los co-cultivos de *E. coli* ATCC 29522 y BAL produjeron una reducción de la viabilidad de *E. coli* a las 24 de incubación en torno a 1,5 log, como mostraron los recuentos bacterianos realizados en medio Chromocult (Tabla 7.9).

Tabla 7.9. Células viables de *E. coli* ATCC 29522 (UFC/ml) en co-cultivo con las distintas BAL

Tiempo (h)	<i>E. coli</i> ATCC 29522 Control +	Co-cultivos		
		A1	C1	C34
0	$7,6 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$
24	$8,2 \times 10^9$	$3,4 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$

3.6. Curvas de crecimiento de *E. coli* en diferentes estrategias

En primer lugar, se evaluó la actividad de los sobrenadantes de monocultivos de BAL, frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* C58 siguiendo la metodología que se describe en el apartado 2.9 (Estrategia 1, Figura 7.4A). En la Figura 7.12 se representan los resultados obtenidos con la cepa productora de BLEE *E. coli* C58, que fueron idénticos a los de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (datos no mostrados). Como se puede observar, la cepa de *E. coli* C58 fue incapaz de crecer en presencia de los tres

sobrenadantes de las cepas lácticas sin diluir (Figura 7.12A, condición M) y comenzó a crecer a medida que éste fue diluido en TSB, a excepción del sobrenadante C1-M/2 (Figura 7.12B, condición M/2). En todos los casos, se alcanzó la densidad óptica del control positivo en la dilución M/8 (Figuras 9.12C, 9.12D y 9.12E). Estos resultados confirman la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las 3 BAL frente a *E. coli* productoras de BLEE observada previamente en los antibiogramas (pocillos; Tabla 7.7), siendo más notable la actividad de *L. plantarum* C1 (Figura 7.12C).

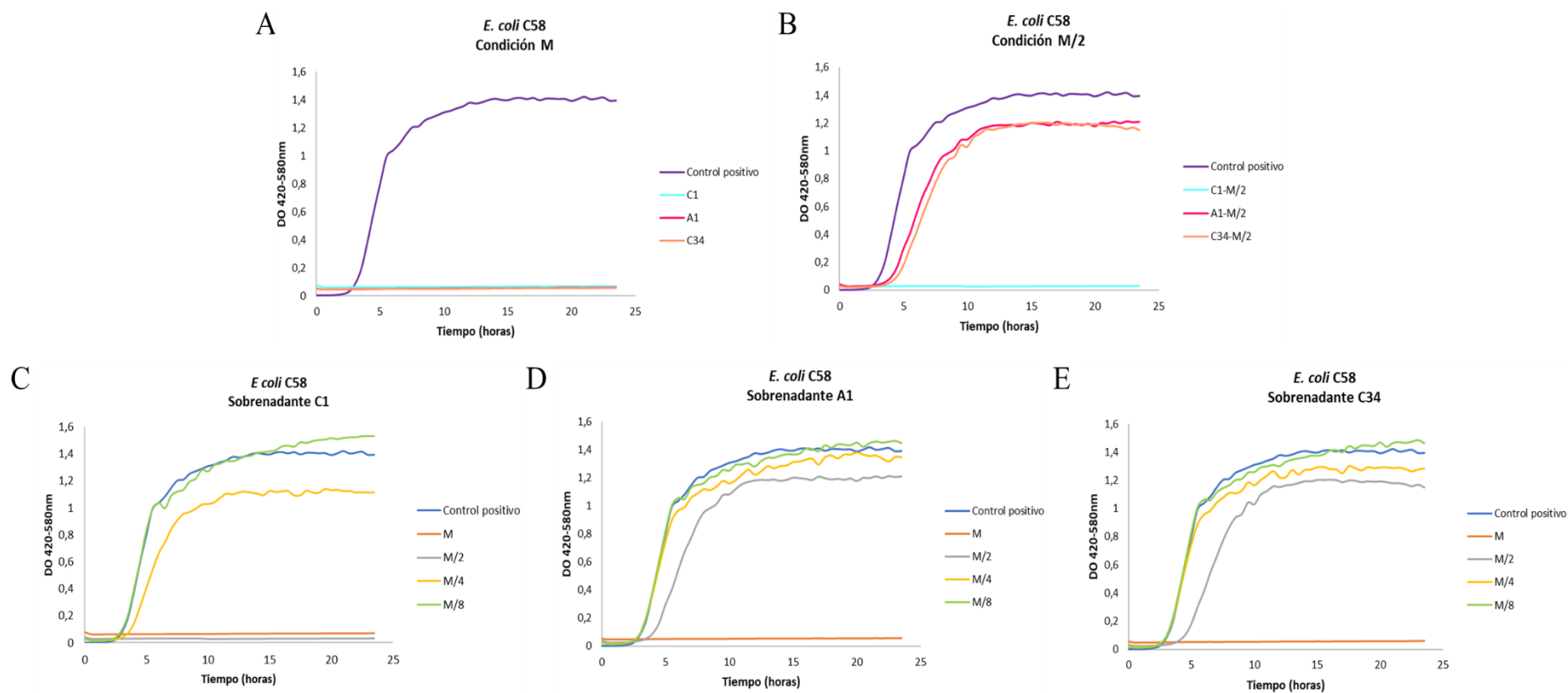


Figura 7.12. Curvas de crecimiento de *E. coli* C58 en presencia de los sobrenadantes de monocultivos de C1, A1 y C34. (A) Sobrenadante sin diluir (condición M). (B) Sobrenadante diluido a la mitad (condición M/2). (C), (D) y (E) Distintas concentraciones de los sobrenadantes C1, A1 y C34, respectivamente. Los valores representados son la media de los distintos triplicados realizados.

En la estrategia 2 se analizaron los sobrenadantes de los distintos co-cultivos en TSB para determinar si la presencia de células de *E. coli* vivas es la que activa a las BAL a llevar a cabo una producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas u otros metabolitos. Como se puede observar en la Figura 7.13, *E. coli* C58 fue capaz de crecer en presencia de los sobrenadantes de los tres co-cultivos, aunque se observó un retraso en la tasa de crecimiento en la condición M (sobrenadante sin diluir) en comparación con el control positivo. En general, a las 7 horas de incubación el control positivo en TSB alcanzó una DO de 1,0 mientras que en la condición M esta cepa llegó solamente a 0,8. Los mismos resultados fueron obtenidos con la cepa *E. coli* ATCC 29522 (datos no mostrados).

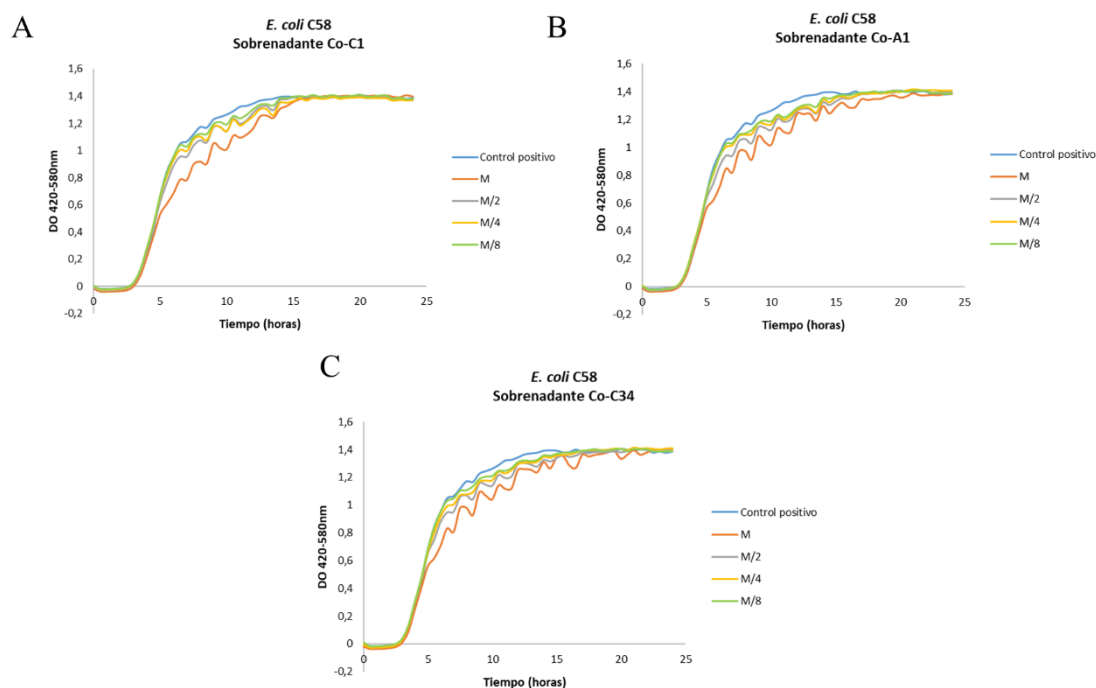
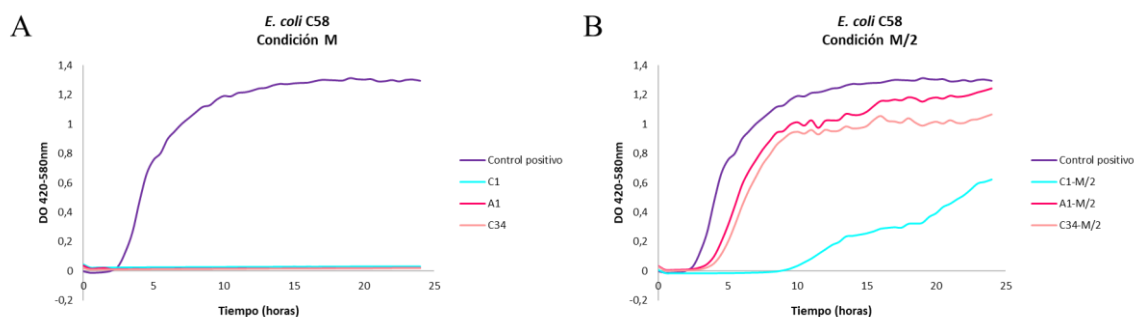


Figura 7.13. Curvas de crecimiento de *E. coli* C58 en presencia de los sobrenadantes de co-cultivos de C1 (A), A1 (B) y C34 (C). En primer lugar, se cultivó la cepa BAL correspondiente en presencia de C58. Posteriormente, la cepa C58 se cultivó en presencia de cantidades progresivamente mayores del sobrenadante de ese co-cultivo anterior. Los valores representados son la media de los distintos triplicados realizados.

A continuación, se realizó un experimento para determinar si los metabolitos originados por *E. coli* tras su crecimiento en caldo TSB eran capaces de activar a las BAL a llevar a cabo una producción eficaz de estos péptidos antimicrobianos, tanto en

caldo TSB como en caldo MRS (Estrategia 3, Figura 7.4C). Los resultados obtenidos en el medio TSB fueron idénticos a los observados con los sobrenadantes de los cocultivos en la estrategia anterior, tanto para *E. coli* ATCC 29522 como para *E. coli* C58 (datos no mostrados). De esta forma, se vio un retraso en la tasa de crecimiento de *E. coli* cuando se enfrentaba al sobrenadante de los distintos cultivos en la condición M, confirmando la actividad antimicrobiana por parte de las BAL cuando está presente *E. coli*. Por otro lado, los resultados obtenidos con los sobrenadantes en medio MRS fueron muy similares a los observados en la estrategia 1. La Figura 7.14 muestra el crecimiento de la cepa *E. coli* C58 (mismo resultado con la cepa *E. coli* ATCC 29522) en la condición M (Figura 7.14A) y condición M/2 (Figura 7.14B). Como se puede observar, esta cepa fue incapaz de crecer en presencia de los tres sobrenadantes en la primera condición y comenzó a crecer a medida que el sobrenadante se diluyó en TSB, observándose un retraso mayor en la tasa de crecimiento con el sobrenadante producido



por la cepa C1 (Figura 7.14B).

Figura 7.14. Curvas de crecimiento de *E. coli* C58 en presencia de los sobrenadantes de C1, A1 y C34 crecidas en MRS con sobrenadante del cultivo de *E. coli* C58. (A) condición M; (B) condición M/2. Los valores representados son la media de los distintos triplicados realizados.

Finalmente, para confirmar que estos resultados se debían a la presencia de bacteriocinas u otros metabolitos (como ácido láctico) en los distintos sobrenadantes y no eran debidos al posible bajo crecimiento de las cepas *E. coli* en el medio de cultivo MRS (único medio disponible en la condición M), se realizó un ensayo de crecimiento

de las dos cepas de *E. coli* en dicho medio. Tal como se puede observar en la Figura 7.15, *E. coli* C58 fue capaz de crecer en MRS, alcanzando una DO de aproximadamente 1,2 a las 21 h de incubación (idénticos resultados fueron observados con *E. coli* ATCC 29522), lo que valida todos los resultados mostrados con anterioridad.

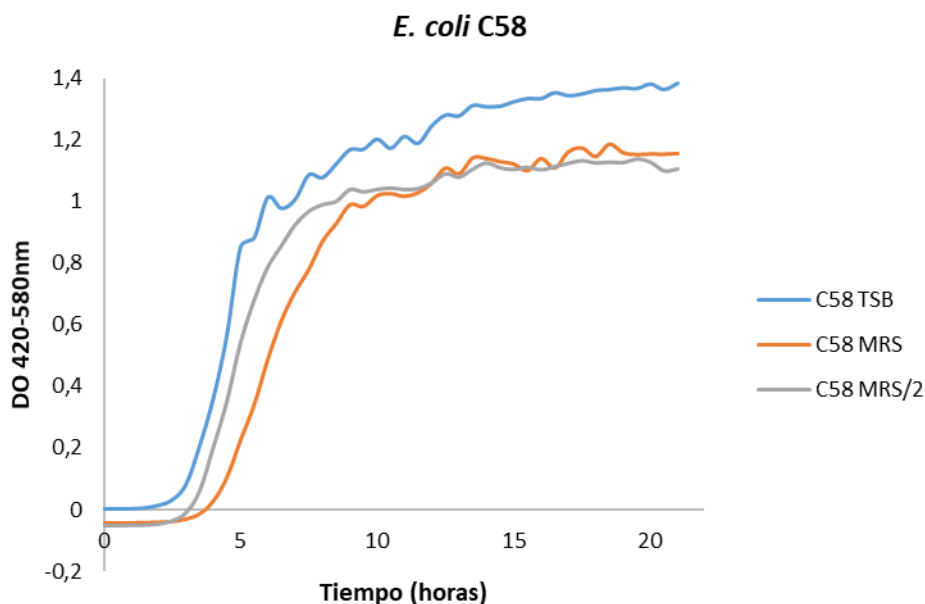


Figura 7.15. Curva de crecimiento de *E. coli* C58 en medio de cultivo MRS. Los valores representados son la media de los distintos triplicados realizados.

En definitiva, se ha confirmado la actividad antimicrobiana producida por estos tres aislados de BAL frente a *Enterobacterias* productoras de BLEE, siendo más activa la cepa de *L. plantarum* C1, que presenta un clúster compatible con una bacteriocina del tipo plantaricina. La actividad antimicrobiana por parte de estas BAL ha tenido lugar independiente de las condiciones de crecimiento, siendo eficaz tanto en monocultivos como en co-cultivos con otras bacterias. Por tanto, no necesitan de la presencia de células vivas ni de metabolitos de *E. coli* para activar la producción de mecanismos antimicrobianos.

4. Discusión

Debido al incremento y expansión de bacterias multirresistentes, la búsqueda de compuestos alternativos a los antibióticos ha puesto en el punto de mira el desarrollo de terapias basadas en el uso de péptidos antimicrobianos (Sánchez-Gómez and Martínez-de-Tejada, 2017; Shahrour et al., 2019). Por ello, en este capítulo hemos evaluado la actividad bactericida de péptidos derivados de la lactoferricina y de bacteriocinas producidas por ciertas BAL frente a cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Los ensayos de sinergia han mostrado que el uso combinado de los péptidos derivados de la lactoferricina (P4-1 y P2-15) junto con el ácido clavulánico y el antibiótico amoxicilina, incrementa el efecto que tiene cada uno de ellos por separado, facilitando la entrada de estos componentes al interior de las bacterias y mejorando la acción del antibiótico. A pesar de obtener cierta mejora, en ninguno de estos dos casos se ha conseguido neutralizar el mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos que presenta la cepa *E. coli* C58 *blactX-M15*, dando lugar a la sensibilización a la amoxicilina ($S \leq 8$, CLSI). La CMI del antibiótico más baja que se ha conseguido es 128 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del P4-1 o 64 $\mu\text{g/ml}$ con el P2-15, en presencia del ácido clavulánico y de concentraciones subinhibitorias de los péptidos. A diferencia de lo observado por Ferrer-Espada (2016) con *P. aeruginosa*, el péptido de la generación P2 ha mostrado mejor actividad permeabilizante que el de cuarta generación (P4-1) frente a *E. coli* productoras de BLEE. En este caso, a pesar de que se formaron combinaciones sinérgicas con concentraciones subinhibitorias, las CMIs obtenidas no fueron suficientemente bajas como para sensibilizar a la bacteria.

En términos de ICIF, la actividad permeabilizante del PMBN superó ampliamente la de ambos péptidos derivados de la lactoferricina, ya que en todas las

concentraciones ensayadas este índice fue menor de 0,5, demostrando sinergia entre los tres componentes estudiados. De esta manera, se consiguió sensibilizar a la cepa C58 a la amoxicilina con las concentraciones más altas de PMBN analizadas (8-16 µg/ml). Además, se ha confirmado que el PMBN tiene una capacidad antimicrobiana baja (512 µg/ml), que tal como señalan Brown and Dawson (2015) resulta inferior a la de su molécula parental (PMB), pero tal como hemos visto, retiene su capacidad de permeabilizar la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Igualmente, este péptido control no actuó en sinergia con la amoxicilina en ausencia del inhibidor de BLEE. Estos resultados están en consonancia con lo reportado por otros autores (Sánchez-Gómez and Martínez-de-Tejada, 2017), que han descrito que el PMBN potencia la acción antimicrobiana de distintos antibióticos y por ejemplo confiere una buena protección frente a la sepsis experimental causada por *P. aeruginosa* (Cirioni et al., 2007). Sin embargo, dado que se ha reportado una significativa toxicidad renal asociada a su compuesto parental PMB y la existencia de cepas resistentes a su acción (Sánchez-Gómez, 2008) que limita su utilidad clínica, es importante llevar a cabo una búsqueda de nuevos péptidos o moléculas con poder bactericida y permeabilizantes, que puedan sustituir en la medida de lo posible el uso de los mismos. Por ello, hemos querido evaluar la habilidad de dos péptidos derivados de la lactoferricina para neutralizar el mecanismo de resistencia estudiado en este trabajo. Aunque los resultados no han sido muy buenos con ambos péptidos, sería interesante ahondar en esta línea y evaluar otros compuestos similares para conseguir devolver la utilidad clínica a antibióticos que han dejado de utilizarse debido a la resistencia bacteriana producida frente a los mismos.

Por otro lado, se ha evaluado la actividad antimicrobiana producida por distintas bacterias lácticas aisladas de animales salvajes frente a *E. coli* productoras de BLEE.

Stedman et al. (2018) demostraron que aislados similares a estas BAL presentan una actividad antimicrobiana significativa, ya que son capaces de inhibir el crecimiento de *M. smegmatis* y reducir la viabilidad y supervivencia de *M. bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG) (Stedman et al., 2018). De esta manera, confirmaron que estos aislados (entre los que se encuentra *E. faecium* C34) actúan como probióticos con efectos beneficiosos que logran mitigar el impacto de distintas enfermedades infecciosas, como la tuberculosis bovina (bTB) causada por *M. bovis* en tejonos y jabalíes europeos (Stedman et al., 2020). Por ello, siguiendo esta misma línea, en este trabajo hemos demostrado por diferentes metodologías (antibiogramas y estudios de la viabilidad bacteriana mediante fluorescencia, densidad óptica y recuentos en placa), que los tres aislados utilizados (C1, A1 y C34) son capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *E. coli*-BLEE, siendo más activa la cepa de *L. plantarum* C1. En primer lugar, los antibiogramas realizados con la metodología *agar spot assay* (en donde se produce el contacto bacteria-bacteria) resultaron dar más información que otras pruebas como los antibiogramas en pocillos, en concordancia con lo reportado por Stedman et al., (2020). Sin embargo, nos hizo preguntarnos si la producción de bacteriocinas y/o metabolitos por parte de las BAL tenía lugar en presencia de *E. coli* o ésta se llevaba a cabo de manera independiente. Así pues, los resultados de las curvas de crecimiento con los sobrenadantes de los distintos monocultivos y co-cultivos, sugiere que las BAL son capaces de llevar a cabo una producción eficaz de sustancias antimicrobianas sin la necesidad de la presencia de células o metabolitos de *E. coli* que activen esta producción, aunque serían necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis. De nuevo estos resultados confirmaron la actividad antimicrobiana de las tres BAL, demostrando que *E. coli* C58 es incapaz de crecer en el sobrenadante (sin diluir) extraído de monocultivos en medio MRS. La inhibición producida por estos tres

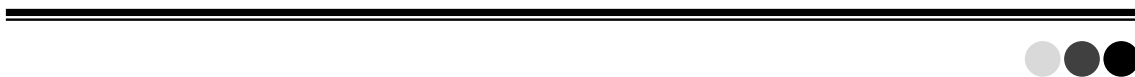
aislados podría ser debida a la síntesis de bacteriocinas o liberación de otros metabolitos (como el ácido láctico) con propiedades antimicrobianas, o bien a una combinación de ambos. Serían necesarios estudios adicionales realizando mutantes en los genes precursores de estas bacteriocinas, para confirmar que la actividad antimicrobiana se debe principalmente a las bacteriocinas, si se demuestra la pérdida de actividad en las cepas mutantes

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped (Hill et al., 2014). En este sentido, la hipótesis que persigue este trabajo es que el uso de BAL podría ser una forma segura de reducir el riesgo de infección causada por Enterobacterias productoras de BLEE, ya que, de manera general, las bacterias lácticas se han estado utilizado ampliamente como probióticos (Ljungh and Wadström, 2001). Aunque algunas especies de *Lactobacillus* ya están reconocidas como probióticos, es necesaria una completa caracterización *in vitro* de las BAL a las que se pretende dar este uso, de forma que se pueda validar la seguridad y el efecto beneficioso como probióticos antes de considerar la aplicación *in vivo*. Por ejemplo, se debe evaluar la susceptibilidad a determinados antibióticos antes de su aplicación. Así, Stedman et al. (2020) identificaron varios genes intrínsecos de resistencia a antibióticos en la cepa de *E. faecium* C34, localizados en el cromosoma y que no son transferibles. En este caso, la EFSA señala que se necesitan investigaciones adicionales para correlacionar las observaciones genotípicas con la expresión fenotípica de la cepa (EFSA, 2012), por lo que serían necesarios nuevos estudios para corroborar estas resistencias. Al mismo tiempo, se demostró que esta cepa de *E. faecium* (C34) era capaz de estimular las respuestas de interferón de tipo I (IFN) contra infecciones virales y que otro *L. plantarum* (P5) similar al aislado C1, es capaz de modular las respuestas fagocíticas proinflamatorias que se

asocian con la protección contra determinados patógenos, coincidiendo con la presencia de marcadores inmunomoduladores en sus genomas (Stedman et al., 2020). Por lo general, las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas no suelen ser activas frente a cepas Gram negativas (Hegemann et al., 2015), pero tal como demuestran Arnison et al. (2013), se ha observado que ciertas bacteriocinas como los sactipéptidos y lassopéptidos podrían inhibir a estos microorganismos bajo ciertas circunstancias ambientales. Además, en concordancia con los resultados observados por Stedman et al., (2020) frente a *S. thermophilus*, las cepas C34 y A1 podrían tener un espectro antimicrobiano más amplio, por lo que serían necesarios estudios adicionales.

En definitiva, la actividad antimicrobiana mostrada por los tres aislados de BAL los postula como posibles probióticos, siendo probablemente la plantaricina producida por *L. plantarum* C1 el mejor candidato contra enfermedades infecciosas producidas por *Enterobacterias* productoras de BLEE. Sin embargo, la actividad observada por ambas cepas de *E. faecium* también resulta interesante, por lo que son necesarios estudios adicionales para la caracterización completa de estas tres BAL antes de considerar su posible aplicación terapéutica.

Discusión general



En esta Tesis doctoral nos hemos planteado ahondar en el conocimiento y control de las resistencias antimicrobianas desde una perspectiva global. Para ello, se han propuesto 4 objetivos relacionados con las líneas estratégicas del Plan Nacional de Resistencias a Antibióticos (PRAN), haciendo especial énfasis en las resistencias a antibióticos β -lactámicos producidas por Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

En los dos primeros objetivos (desarrollados en 4 capítulos) se ha llevado a cabo la **vigilancia** e investigación sobre la **difusión** de la resistencia a antibióticos en el entorno ambiental, animal y humano. En lo que respecta al **entorno ambiental** (capítulo 1), se ha observado la amplia presencia de bacterias resistentes a los antibióticos incluidas en la lista de patógenos prioritarios de la OMS en distintos ambientes acuáticos (ríos, colectores y estaciones depuradoras de aguas residuales [EDAR]) de la zona norte de España y sur de Francia (Pérez-Etayo et al., 2020). La presencia de estas bacterias resistentes en una región con elevada actividad ganadera (donde destacan principalmente las explotaciones porcinas), muestra el impacto de la actividad humana en la propagación de estas resistencias. Dado que los resultados indicaron que un porcentaje mayoritario (58,2%) de estas bacterias fueron aisladas de colectores de hospitales, mataderos y EDAR, se constata que en la actualidad se están realizando tratamientos insuficientes de estas aguas residuales que eliminen o reduzcan la carga de microorganismos portadores de resistencias antimicrobianas (incluidos los patógenos) (Makowska et al., 2020). No solo se aislaron bacterias resistentes en esta región, sino que otros grupos de investigación dentro del mismo proyecto (INTERREG POCTEFA EFA183/16/OUTBIOTICS) detectaron antibióticos en estas mismas muestras (Moles et al., 2020). La azitromicina se detectó en mayores concentraciones

(11,3 g/día por 1000 habitantes), aunque también fue notable la presencia de enrofloxacino, sulfadiazina y trimetoprima.

Se calcula que en la actualidad se dispensan en el mundo unos 2.000 productos farmacéuticos, que incluyen medicamentos recetados, medicamentos terapéuticos de venta libre y medicamentos veterinarios (Burns et al., 2018). Muchos de estos compuestos no son metabolizados completamente por el cuerpo, por lo que se estima que entre el 30 y el 90% de la dosis administrada por vía oral se excreta generalmente como principio activo a través de la orina y heces y, como resultado, termina en las aguas residuales (McEneff et al., 2014). Así pues, estos productos están presentes en el medio ambiente como consecuencia de la producción farmacéutica (veterinaria y humana), el uso en la producción de alimentos y ganadería, utilización por los pacientes (uso doméstico y hospitales) y por una eliminación inadecuada de los productos caducados (Figura D.1). Los que se detectan con mayor frecuencia son hormonas, antibióticos, analgésicos, antidepresivos, productos farmacéuticos contra el cáncer, pesticidas y parasiticidas.

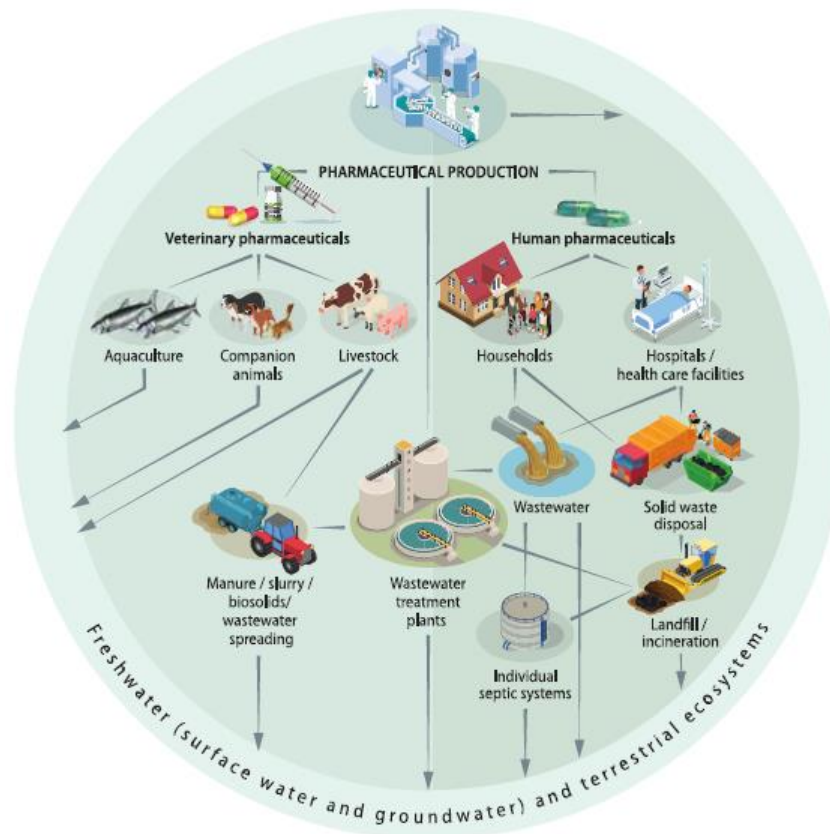


Figura D.1. Principales vías de liberación de productos farmacéuticos en el medio ambiente. Adaptado de la *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2019).

La presencia de todos estos productos en ecosistemas terrestres y de agua dulce deriva en la absorción de los mismos por parte de animales y plantas, dando lugar a una bioacumulación (OECD, 2019). Se ha demostrado que ciertos productos causan efectos adversos no deseados en organismos acuáticos, que incluyen mortalidad, cambios en la fisiología, en el comportamiento y en la reproducción (EAHC, 2013). Además, se ha estimado que el 10% de los productos farmacéuticos tienen un riesgo ambiental potencial, que incluye persistencia (capacidad para resistir la degradación en el medio acuático), bioacumulación (acumulación en el tejido adiposo de los organismos acuáticos) y toxicidad (potencial tóxico sobre estos organismos) (Küster and Adler, 2014). De esta manera, el uso excesivo y la descarga de antibióticos en el agua está agravando el problema de la resistencia a los antimicrobianos, ya que supone una presión selectiva los microorganismos.

La presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente ha generado preocupación entre los reguladores del agua potable, gobiernos, proveedores de agua y del público en general. Así pues, la OECD recomienda adoptar un enfoque colectivo para abordar la eliminación de los productos farmacéuticos en el medio ambiente, mediante el desarrollo de una estrategia y un plan de acción nacional para gestionar los riesgos ambientales (OECD, 2019). En ese sentido, se han propuesto las cinco estrategias que se indican a continuación:

1. Mejorar el **conocimiento, la comprensión** y la presentación de **informes** sobre la aparición, el destino, la toxicidad y los riesgos ecológicos que tienen para la salud humana los residuos farmacéuticos en las masas de agua, con el fin de sentar las bases para futuras medidas de reducción de la contaminación.
2. **Enfoques** dirigidos para imponer, incentivar o fomentar medidas con el fin de **prevenir la liberación de productos farmacéuticos en el agua**. Están dirigidos principalmente a empresas farmacéuticas e instalaciones de fabricación.
3. **Enfoques orientados al uso** para imponer, incentivar o fomentar la reducción del consumo inadecuado y excesivo de productos farmacéuticos. Están diseñados para informar y cambiar los comportamientos y prácticas de uso en médicos, veterinarios, farmacéuticos, pacientes y agricultores.
4. **Otras medidas** como complemento de las estrategias 1-3, que incentiven o fomenten un mejor tratamiento de los desechos y aguas residuales para eliminar los residuos farmacéuticos después de su uso o liberación al medio acuático.

5. **Colaboración y un enfoque común**, combinando las cuatro estrategias anteriores e involucrando a varios sectores políticos. Es mucho más probable que esta acción se amplíe y se mantenga si se integra en políticas y proyectos más amplios de salud, agricultura y medio ambiente.

En definitiva, es necesario desarrollar estrategias y métodos efectivos de tratamiento que eliminen los contaminantes microbianos y residuos farmacéuticos de las aguas residuales, para evitar así una mayor contaminación ambiental y prevenir la dispersión y selección de las resistencias bacterianas.

Entre las estrategias a desarrollar, se deberían incluir programas de vigilancia de distintas bacterias patógenas y de genes implicados en estas resistencias. Como hemos visto en el [capítulo 2](#), para implementar programas de vigilancia sería muy conveniente realizar el seguimiento de distintos marcadores genéticos con especial relevancia clínica en el medioambiente, y más concretamente, en entornos acuáticos. Dado que se han encontrado STs y CCs que constituyen clones importantes relacionados con la diseminación de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos (23CC, 10CC, 131CC y 38CC), la detección de éstos en cepas aisladas de distintos ambientes podría considerarse como una alerta en la diseminación de resistencias. El hecho de que algunas cepas aisladas de depuradoras se incluyan en estos 4 CC y muestren perfiles idénticos a cepas aisladas de otros entornos (alimentos y portadores sanos), resaltan de nuevo la importancia que adquieren las aguas en la diseminación de resistencias bacterianas (Figura D.2).

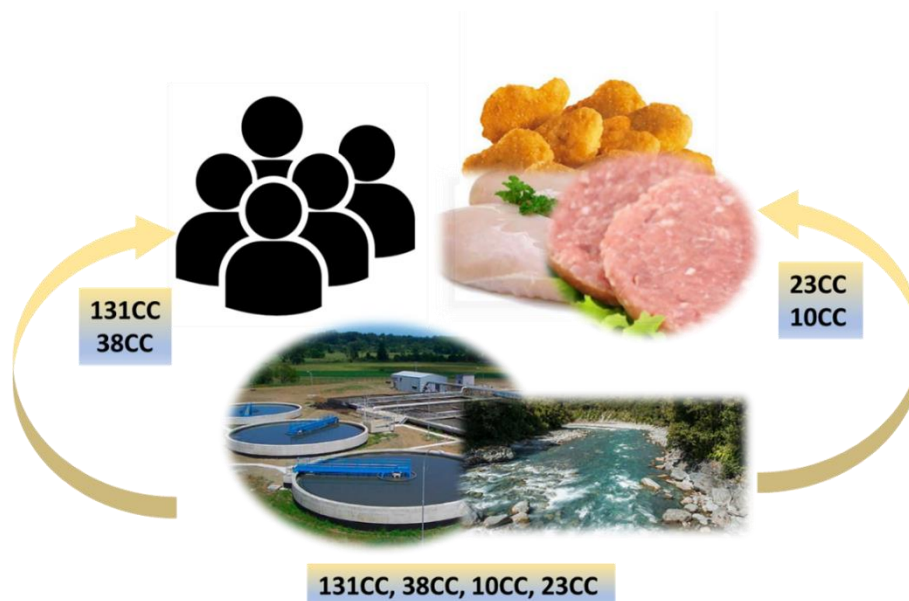


Figura D.2. Principales complejos clonales detectados entre los distintos entornos en el presente trabajo

En este mismo sentido, también sería muy ventajoso determinar si la presencia de otros indicadores genéticos, como los integrones y secuencias de inserción, pudiera servir como marcador del riesgo de transmisión de resistencias en dichos entornos. De acuerdo con Gillings et al. (2015), el integrón de clase 1 podría usarse como un indicador de la contaminación antropogénica. Por ello, el objetivo del capítulo 3 ha sido detectar éste y otros marcadores genéticos asociados con la adquisición y dispersión de genes *bla*. Así, los resultados demostraron la alta prevalencia de diferentes elementos genéticos horizontales (*intI*, IS26, IS26-ISEc1) entre los aislados de *E. coli* productores de BLEE de muestras alimentarias, ambientales y humana.

En definitiva, la coexistencia de diversos tipos de integrones y secuencias de inserción reveló el riesgo potencial de diseminación de resistencias antimicrobianas entre bacterias ambientales (granjas y piensos, muestras de alimentos, EDAR y ríos) y humanas (portadores sanos y aislados clínicos). A su vez, la presencia de genes asociados con factores de virulencia en estas mismas cepas (capítulo 4), aportó

información para comprender mejor la patogenicidad asociada a ellas. De esta manera, se ha podido observar que las cepas potencialmente patógenas, asociadas con el complejo 131CC y filogrupo B2, fueron portadoras de tres o más factores de virulencia. Asimismo, los genes *fimA*, *papC* y *aer* (que codifican para las fimbrias de tipo 1, fimbrias P y un sideróforo) fueron detectados en cepas aisladas de todos los entornos, mientras que *papG* III (que codifica para adhesina de las fimbrias P) se relacionó principalmente con cepas clínicas. Además, las aguas residuales constituyeron un punto de difusión para los genes *cnfI* y *hlyA*, que codifican distintas toxinas (factor citotóxico necrotizante tipo 1 y citotoxina hemolisina A, respectivamente).

Finalmente, medir la tasa de transferencia horizontal de estos marcadores genéticos y factores de virulencia, sería de gran valor en estos programas de vigilancia, ya que como establece Bürgmann et al. (2018), todavía sigue siendo un tema desconocido. Los resultados obtenidos en esta tesis han mostrado una frecuencia de conjugación promedio de $1,2 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$ en las cepas aisladas de ambientes acuáticos, siendo significativamente más alta que la observada en cepas aisladas de granjas y alimentos ($p < 0,05$), con frecuencias de $1,5 \times 10^{-4} \pm 2,9 \times 10^{-4}$ y $9,6 \times 10^{-4} \pm 2,0 \times 10^{-3}$, respectivamente. Estos resultados revelan de nuevo la importancia que adquiere el medio acuático para el intercambio de genes y resistencias a antibióticos, especialmente los entornos de aguas residuales. Se constata así la necesidad de establecer medidas preventivas para controlar esta diseminación de las resistencias entre distintos nichos ambientales y frenar así sus posibles efectos en salud humana y animal.

En relación con el **entorno animal**, la hipótesis de partida es que una disminución de la presión antibiótica en este ambiente podría reducir la presencia y dispersión de bacterias resistentes entre los distintos ecosistemas. De esta manera, en el objetivo 3 se planteó una estrategia **preventiva** desarrollando medidas alternativas al

uso de antibióticos en producción animal. Así, se ha evaluado la capacidad bactericida de un nanomaterial con base plata para su inclusión como aditivo en piensos, en el marco del proyecto INTERREG POCTEFA EFA183/16/OUTBIOTICS. El nanomaterial caolín-plata desarrollado ha mostrado una correcta actividad antibacteriana frente al amplio espectro de bacterias ensayadas, incluidas las cepas multirresistentes (capítulo 5). Desde el punto de vista microbiológico, este producto cumple con las expectativas de ser un buen candidato como aditivo zootécnico en piensos de animales y reducir así el empleo de antibióticos. La utilización de medicamentos para el tratamiento de animales productores de alimentos (en donde se incluyen los piensos medicamentosos) está sometida a una estricta regulación que tiene como finalidad proteger la salud pública y evitar la presencia de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos procedentes de animales que habían sido previamente tratados (MAPAMA, 2017). Todas las sustancias activas que forman parte de los medicamentos veterinarios son sometidas a un estricto proceso de evaluación de seguridad regulado por el Reglamento 470/2009, por el que se establecen procedimientos para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal (UE, 2009). Además, la guía de la *European Food Safety Authority* (EFSA) sobre la evaluación del riesgo de utilización de nanotecnologías en alimentos y piensos (EFSA, 2018a), establece el procedimiento para realizar una evaluación de bioseguridad de este tipo de aditivos. En ese sentido, en el proyecto INTERREG POCTEFA EFA183/16/OUTBIOTICS se han realizado estudios adicionales para evaluar la bioseguridad del nanomaterial caolín-plata (estudios toxicológicos *in vitro* e *in vivo*) y la posible acumulación de plata en muestras biológicas, así como el impacto ambiental de heces y purines. Los resultados obtenidos tanto a nivel de seguridad animal como ambiental son muy prometedores.

Finalmente, en el contexto de **salud humana**, en el objetivo 4 se han evaluado métodos de **diagnóstico** rápido para Enterobacterias productoras de BLEE (capítulo 6), así como alternativas de **tratamiento** para infecciones causadas por dichas bacterias resistentes (capítulo 7). A nivel clínico, una de las herramientas de diagnóstico rápido de microorganismos de mayor proyección es la tecnología del MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*). La aplicación de dicha tecnología para la detección de bacterias resistentes es todavía limitada, con cierto desarrollo en la detección de actividad β -lactamasas y carbapenemasas utilizando el equipo MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) por su mayor inversión en los programas necesarios para el análisis de espectros antibióticos (Oviaño et al., 2017). Por ello, en este trabajo se ha evaluado la capacidad de detectar estas resistencias utilizando el equipo VITEK[®] MS (bioMérieux), que también tiene mucha presencia a nivel de clínica humana. Aunque quedó descartado el uso de ceftazidima y ceftriaxona con este equipo, se ha podido definir un protocolo de hidrólisis de cefotaxima que permite la detección de cepas productoras de BLEE del tipo CTX-M1 en 1 hora. Dado que solamente se utilizaron dos cepas por cada tipo de BLEE, es necesario ampliar el estudio con otro tipo de variantes de genes *bla*, con cepas portadoras de varios genes simultáneamente, así como con otros inhibidores de β -lactamasas distintos al ácido clavulánico (tazobactam, avibactam o APBA). De igual manera, se requieren más ensayos para mejorar la metodología de detección de carbapenemasas mediante la hidrólisis del ertapenem, ya que no se ha conseguido establecer un protocolo adecuado.

Por otro lado, se han abordado dos estrategias de tratamiento para infecciones causadas por Enterobacterias productoras de BLEE. La primera de ellas se basa en el uso de dos péptidos antimicrobianos derivados de la lactoferricina (P4-1 y P2-15).

Aunque concentraciones subinhibitorias de los dos péptidos en presencia de 1 µg/ml de ácido clavulánico consiguieron reducir la CMI de la amoxicilina (128 µg/ml en el caso del P4-1 y 64 µg/ml con el P2-15), ninguno de ellos logró llegar a la sensibilización de la cepa de *E. coli* a dicho antibiótico ($S \leq 8$; CLSI, 2018). A pesar de que los resultados no fueron tan buenos como los obtenidos con el péptido PMBN (del que se ha reportado toxicidad renal y cepas resistentes a su acción), sigue siendo interesante profundizar en esta línea de investigación y evaluar otros compuestos similares, dado el interés actual del uso de AMPs como estrategia de tratamiento. Éstos, juegan un papel muy importante en la ecología microbiana y contribuyen a la inmunidad innata de los organismos mediante la inhibición de microorganismos invasores (Moravej et al., 2018).

Finalmente, en la segunda estrategia se ha evaluado el posible uso de bacteriocinas producidas por 3 cepas de bacterias ácido-lácticas aisladas de animales salvajes como alternativa de tratamiento frente a infecciones causadas por Enterobacterias productoras de BLEE. Los resultados mostraron que i) las tres bacterias ácido-lácticas evaluadas son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias resistentes por lo que podrían utilizarse como alternativa al uso de antibióticos, y ii) el interés que presentan como potenciales probióticos, dado que son capaces de producir sustancias antimicrobianas sin necesidad de la presencia de células vivas ni de metabolitos de *E. coli* que activen esta producción. De esta manera, la ingesta preventiva de estas bacterias vivas podría proteger al organismo ante la posible llegada de una bacteria patógena. Sin embargo, tal como hemos indicado en el capítulo 7, son necesarios estudios adicionales para una caracterización completa de estas tres BAL antes de considerar su uso terapéutico. Como parte de esta caracterización, sería muy interesante llevar a cabo un estudio de persistencia gastro-intestinal, para establecer si son capaces

de sobrevivir a los jugos gástricos o si, por el contrario, necesitan ser encapsuladas de alguna manera concreta, como en el caso de las nanopartículas de plata. Además, tal como señala la EFSA se necesita llevar a cabo estudios de bioseguridad en los que se confirme la ausencia de genes de resistencia y se proporcione información relacionada con la toxigenicidad y patogenicidad para los seres humanos antes de su autorización (EFSA, 2018b).

Aunque ya se conocía el efecto de las bacterias ácido-lácticas y sus metabolitos como inhibidores de ciertos patógenos en matrices alimentarias (Hammami et al., 2013), actualmente ha crecido el interés en su uso como agentes terapéuticos y se están llevando a cabo diferentes investigaciones que muestran su eficacia en el tratamiento de infecciones en humanos y animales (Cursino et al., 2006; Dabour et al., 2009; Kannan and Mankin, 2011). De esta manera, Hammami et al. (2013) informan de ensayos exitosos en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias patógenas y, por tanto, establecen que podrían usarse en el futuro como alternativa a los antibióticos existentes en la actualidad. También se ha demostrado la actividad antimicrobiana de la lacticina 3147 y nisina A contra cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) (Piper et al., 2009). De la misma manera, se evaluó la eficacia de la microcina J25 (MccJ25) en un modelo murino de infección por *Salmonella* (Lopez et al., 2007). A pesar de esto, la inhibición *in vivo* de distintos patógenos sigue siendo todavía incierta y aún queda recorrido antes de que las bacteriocinas sean una alternativa en la práctica clínica.

En la introducción general de esta tesis doctoral (Figura I.11), se menciona que la línea estratégica número 6 propuesta por el PRAN se centra en la **comunicación** y **sensibilización** de la población frente a esta problemática. El objetivo es concienciar a los consumidores sobre los beneficios del uso racional de los antibióticos e informar

sobre los riesgos de las resistencias, para llevar a cabo un uso prudente de los mismos. En este sentido, en España se han llevado a cabo numerosas campañas patrocinadas por organismos oficiales como, por ejemplo: “Los antibióticos no sirven para todo”, “Antibióticos: tómatelos en serio”, “Ni menos, ni más, ¡Tú decides! También se han realizado conmemoraciones para el “día mundial de la higiene de manos” o el “día Europeo del uso prudente de los antibióticos”. Desde la Universidad de Navarra nos hemos sumado a estas campañas y celebraciones, realizando distintas charlas y experimentos divulgativos durante la “Semana de la Ciencia”, con diferentes colegios e institutos de Navarra. Además, durante los cursos 2017-2018 y 2018-2019 hemos participado en la *Small World Initiative*, conocida ahora como Micromundo (rama española de los proyectos internacionales *Tiny Earth* y *Small World Initiative*). Esta iniciativa es un programa innovador que fue diseñado en 2012 en la Universidad de Yale (EEUU) por la doctora Jo Handelsman, para motivar a los estudiantes hacia la elección de un grado en Ciencias Experimentales, al tiempo que abordaba el problema global de la reducida disponibilidad de antibióticos eficaces debido a la aparición de mecanismos de resistencia. Este programa se centra en un curso de Biología básico en el cual los estudiantes de distintos colegios e institutos llevan a cabo trabajo de campo e investigación sobre muestras de suelo en busca de bacterias productoras de nuevos antibióticos. Los estudiantes recolectan muestras de tierra en distintas localizaciones, aíslan bacterias y ensayan su actividad frente a microorganismos de relevancia clínica (microorganismos ESKAPE). Este aspecto es particularmente relevante, puesto que dos tercios de los antibióticos disponibles proceden de bacterias u hongos aislados de suelos (Hernandez et al., 2017). Así, durante el curso 2017-2018 participaron 222 alumnos de 9 centros escolares de Navarra y fueron impartidas 5 sesiones de 2 horas por 50 alumnos voluntarios (procedentes de los grados de Biología, Bioquímica o Farmacia) y

por 8 profesores del Departamento de Microbiología de la Universidad de Navarra. En total, se obtuvieron 1.760 aislamientos de los cuales 75 mostraron actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, mientras que 1 aislamiento presentó actividad bactericida frente a microorganismos Gram positivos y negativos. Durante el curso 2018-2019 se llevó a cabo la caracterización de estas cepas aisladas, perteneciendo en su mayoría a los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Micrococcus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*. Además, se repitió de nuevo la iniciativa con otros institutos para la búsqueda de nuevas bacterias capaces de producir antibióticos. En este caso participaron 145 alumnos de 6 centros y se obtuvieron un total de 923 aislados, de los cuales 59 mostraron actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, 19 frente a Gram negativas y 8 frente a ambos tipos bacterianos. En definitiva, este proyecto de Aprendizaje-Servicio y ciencia ciudadana, nos ha permitido acercarnos a los jóvenes para concienciarles sobre el impacto que tiene la resistencia a los antibióticos en salud humana, animal y medioambiente.

Cuando todo apuntaba a que la resistencia a los antibióticos iba a ser la gran pandemia del siglo XXI si para el año 2050 no se ponen medidas y soluciones eficaces, el virus SARS-CoV-2 ha emergido y diseminado con rapidez por todo el mundo en el año 2020, dando lugar a la primera pandemia de este siglo (Jakovljevic et al., 2020). El impacto que la COVID-19 está causando en todos los niveles (pérdidas de vidas humanas, consecuencias sociales, sanitarias, daño económico, etc.) tiene una repercusión trascendental y de largo alcance (Vindegaard and Benros, 2020). Todavía es pronto para saber cómo acabará esta pandemia, pero no tenemos que olvidar que la ciencia nos puede ayudar a controlar la situación y, en definitiva, nos puede preparar para la próxima pandemia.

La COVID-19 ha constituido un reto en todos los aspectos de la atención sanitaria, incluyendo también el uso efectivo de los antibióticos y el manejo de infecciones bacterianas. De esta manera, la OMS ha advertido que el incremento de la prescripción excesiva o inadecuada de tratamientos antibióticos en el contexto de la pandemia COVID-19, podría facilitar el desarrollo de bacterias resistentes, reducir la eficacia de futuros tratamientos y, con ello, aumentar el número de muertes provocadas por este problema (<https://www.who.int/news/item/01-06-2020-record-number-of-countries-contribute-data-revealing-disturbing-rates-of-antimicrobial-resistance>).

Aunque la COVID-19 es una infección vírica y, por tanto, no se trata ni se previene con antibióticos, hay pacientes diagnosticados en los que existe coinfección bacteriana, por lo que se debe extremar la prudencia en la utilización de este tipo de medicamentos. En este sentido, de acuerdo con los análisis del PRAN, el incremento a nivel hospitalario del consumo de antibióticos en un 40% en marzo del 2020, responde a la incertidumbre diagnóstica al inicio de esta pandemia, así como a la prescripción de los mismos en pacientes COVID-19 con coinfección bacteriana (PRAN, 2020). Por ello, desde el PRAN han publicado una serie de recomendaciones dirigidas a profesionales sanitarios para mejorar la prescripción y el uso de estos medicamentos durante el transcurso de esta pandemia (Figura D.3).

Recomendaciones para la prescripción de antibióticos en la pandemia de COVID-19



Infecciones bacterianas en pacientes COVID-19

- busca asesoramiento del equipo PROA de tu hospital o área 
- apoya la decisión de la prescripción antibiótica en valores indirectos que evidencien infección bacteriana (p.ej. procalcitonina) 
- evita profilaxis con antibióticos para prevenir neumonía bacteriana 
- ante la falta de evidencia, evita el uso sistemático de azitromicina en combinación con hidroxicloroquina en el tratamiento de COVID-19 
- recuerda interacciones y toxicidad de los tratamientos (p.ej. prolongación del intervalo QT o interacciones catiónicas) 
- si es posible, refuerza la comunicación con el paciente explicando que los antibióticos se administran por infección bacteriana

Infecciones bacterianas en otros pacientes

- basa la elección del antibiótico en las guías locales 
- establece la duración mínima posible del tratamiento 
- adecúa la dosis de antibiótico al tipo de infección y las circunstancias del paciente 
- considera el cambio de vía parenteral a vía oral del tratamiento antibiótico para disminuir infecciones asociadas a catéteres 
- reevalúa cada 24-48 horas y ajusta el tratamiento antibiótico según evolución y resultados microbiológicos 

Figura D.3. Recomendaciones para la prescripción de antibióticos durante la pandemia COVID-19 (PRAN, 2020)

Al igual que el resto de los virus pertenecientes a la familia coronavirus, el SARS-CoV-2 puede causar infecciones tanto en personas como en animales, lo que significa que la COVID-19 es una zoonosis (Haider et al., 2020). En este sentido, en sanidad animal, la pandemia ha reforzado las medidas que ya se aplicaban de acuerdo con las recomendaciones del PRAN en el ámbito veterinario, que se centran en reducir el riesgo de contagio entre el personal de las granjas para frenar la transmisión del virus, reducir la necesidad de utilizar antibióticos, mejoras en la bioseguridad de las

instalaciones, programas de formación específicos para los trabajadores, organización del trabajo enfocada a la minimización de riesgos y gestión de los residuos.

En este aspecto, los expertos que participaron en la jornada EAAD (*European Antibiotic Awareness Day*) 2020, señalaron una vez más la importancia de trabajar de forma multidisciplinar con el enfoque *One Health* para proteger la salud de todos. Y es que la COVID-19 ha vuelto a poner de manifiesto la conexión existente entre la salud humana, sanidad animal y medioambiente, ofreciendo una oportunidad de aprendizaje para frenar así futuras pandemias.

Conclusions



Regarding the antimicrobial resistance **surveillance**,

1. A wide prevalence of antibiotic resistant bacteria has been detected in aquatic environments of POCTEFA territory (northern Spain and southern France), being carriers for at least one category of antibiotic resistances 96.4% of the sampled rivers and 100% of the effluents from wastewater treatment plants (WWTP) and hospital and slaughterhouses collectors, with penicillin/cephalosporin resistance as the most prevalent.
2. Multidrug resistances were observed in 96.4% of 55 isolated strains included in the critical and high priority list proposed by the WHO, being the ESBL-producing bacteria the most extended ones (mainly *E. coli*), followed by carbapenem and vancomycin resistant bacteria.
3. The genotypic characterization of isolates confirmed the prevalence of TEM1-278, CTX-M15 and CTX-M1 types among *bla* genes, the KPC-type carbapenemases and the *vanB* gene in *E. faecium* VRE. In addition, the *mcr-1* gene was detected in one *E. coli* strain isolated from a rabbit slaughterhouse collector, suggesting the use of colistin in animal production.
4. The phylogenetic study of ESBL-producing *E. coli* showed the prevalence of phylogroup A among strains coming from animal production areas and aquatic ecosystems, while human strains isolated from healthy carriers were associated with the virulent phylogroup B2. The wide presence of phylogroups B2 and D in strains from aquatic environments warns about the spread of potentially pathogenic strains through these environments.
5. The MLST study determined that 23CC, 10CC, 131CC and 38CC complexes could be used as genetic markers of resistance dissemination, as they were detected mainly in aquatic ecosystems but also in strains from food and human

origin. The prevalent type sequence in healthy carriers and aquatic environments was ST131, associated with the 131CC and phylogroup B2, highlighting the importance that waters acquire in the dissemination of resistant clones.

Regarding the resistances **dissemination**,

6. The study of mobile genetic elements in ESBL-producing *E. coli* showed the wide presence and dissemination of *intI2* (92%) and IS26 (99.4%). The genetic pattern IS26-ISEcp1 (related to the pathogenic clone ST131) was present in 22% of the strains and, for the first time to our knowledge, the genetic complex ISEcp1-IS26-IS903-ISCR1 was detected.
7. Despite all the strains were positive for one or more genes associated with virulence factors, clinical ones contain the greatest amount. The genes, *fimA*, *papC* and *aer* (coding for fimbriae and siderophores) were detected in all environments, *papG* III was associated with clinical strains and sewage constituted a point of diffusion for the toxins cytotoxic necrotizing factor type 1 and hemolysin A, encoded by *cnf1* and *hlyA* genes.
8. 100% of the ESBL-producing *E. coli* strains tested performed efficient gene transfer, although those isolated from aquatic environments showed significantly higher conjugation frequencies. This is another evidence of the potential risk of resistances dissemination through this ecosystem.

Regarding **preventive** strategies in animal production,

9. The kaolin-silver nanoparticles developed in the OUTBIOTICS project have shown antimicrobial activity against a wide spectrum of bacteria, including strains resistant to β -lactams, carbapenems, vancomycin and colistin.
10. Bactericidal activity of nanoparticles was higher against Gram negative bacteria, showing lower MBC for *P. aeruginosa* (7.8 μ g/ml) and *E. coli* and *Salmonella*

(15.6 µg/ml) than that observed in the case of *S. aureus* and *E. faecium* (31.3 µg/ml and 250 µg/ml, respectively). Moreover, the inhibition curves showed a faster bactericidal activity against Gram negative bacteria (sensitive and resistant ones), with the total elimination of the initial population in only 2-4 h.

Regarding alternative tools for the **diagnosis** and **treatment** of infections caused by ESBL producing bacteria,

11. A procedure for the detection of ESBL-producing strains (CTX-M1 type) in 60 minutes has been standardized in the VITEK®-MS RUO equipment, by using cefotaxime without buffer solution and the possibility to include the inhibitor clavulanic acid to test the β-lactamase activity.
12. Neither of the two antimicrobial peptides derived from lactoferricin (P4-1 and P2-15) were capable of sensitizing ESBL-producing *E. coli* to amoxicillin, while positive results were observed with the control peptide PMBN.
13. The antimicrobial activity produced by three BAL isolates (C1, A1 and C34) against ESBL-producing *E. coli* was confirmed, being the strain *L. plantarum* C1 the most active. These results encourage further investigations for the future use of these lactic strains as probiotics or as an alternative to antibiotics.

Bibliografía



- Abad-Álvaro, I., Trujillo, C., Bolea, E., Laborda, F., Fondevila, M., Latorre, M. A., et al. (2019). Silver nanoparticles-clays nanocomposites as feed additives: Characterization of silver species released during in vitro digestions. Effects on silver retention in pigs. *Microchem. J.* 149, 104040. doi:10.1016/j.microc.2019.104040.
- Abdelrahman, D. N., Taha, A. A., Dafaallah, M. M., Mohammed, A. A., El Hussein, A. R. M., Hashim, A. I., et al. (2021). β -lactamases (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTXM-1, *bla*VEB, *bla*OXA-1) and class C β -lactamases gene frequency in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical specimens in Khartoum State, Sudan: a cross sectional study. *F1000Research* 9, 774-790. doi:10.12688/f1000research.24818.3.
- Abdulhussain Kareem, R., and Razavi, S. H. (2020). Plantaricin bacteriocins: As safe alternative antimicrobial peptides in food preservation—A review. *J. Food Saf.* 40, 12. doi:10.1111/jfs.12735.
- Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A. M., Blanco, J., Blanco, J. E., et al. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 397–406. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x.
- AEMPS (2014). Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos. Available at: www.aemps.gob.es.
- AEMPS (2019a). Consumo total de antibióticos. *Agencia Española Medicam. y Prod. Sanit.* 8, 4.
- AEMPS (2019b). Plan Nacional Frente a la Resistencia a los Antibióticos 2019-2021. *Agencia Española Medicam. y Prod. Sanit.*, 37. Available at: http://resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/pran_2019-2021_0.pdf?file=1&type=node&id=497&force=0.
- Ahmed, M. O., and Baptiste, K. E. (2018). Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microb. Drug Resist.* 24, 590–606. doi:10.1089/mdr.2017.0147.
- Ali, T., Ur Rahman, S., Zhang, L., Shahid, M., Zhang, S., Liu, G., et al. (2016). ESBL-producing *Escherichia coli* from cows suffering mastitis in China contain clinical class 1 integrons with CTX-M linked to ISCR1. *Front. Microbiol.* 7, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.01931.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., and Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 6235–6254. doi:10.3390/ijerph10126235.
- Alonso, C. A., González-Barrio, D., Ruiz-Fons, F., Ruiz-Ripa, L., and Torres, C. (2017). High frequency of B2 phylogroup among non-clonally related fecal *Escherichia coli* isolates from wild boars, including the lineage ST131. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 1–7. doi:10.1093/femsec/fix016.
- Ammons, M. C., and Copié, V. (2013). Mini-review: Lactoferrin: a bioinspired, anti-biofilm therapeutic. *Biofouling* 29, 443–455. doi:10.1080/08927014.2013.773317.
- Andersen, J. H., Jenssen, H., and Gutteberg, T. J. (2003). Lactoferrin and lactoferricin inhibit Herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir. *Antiviral Res.* 58, 209–215. doi:10.1016/S0166-3542(02)00214-0.

- Angeletti, S., and Ciccozzi, M. (2019). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: An updating review. *Infect. Genet. Evol.* 76, 104063. doi:10.1016/j.meegid.2019.104063.
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Kato, N., et al. (1995). A Novel Integron-Like Element Carrying the Metallo- β -Lactamase Gene *bla*IMP. *Microbiology* 39, 1612–1615. doi:10.1128/AAC.39.7.1612.Updated.
- Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H., et al. (2000). Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram- negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* 38, 40–43.
- Arduino, S. M., Roy, P. H., Jacoby, G. A., Betina, E., Pineiro, S. A., Centron, D., et al. (2002). *bla*CTX-M-2 Is Located in an Unusual Class 1 Integron (In35) Which Includes Orf513. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2303–2306. doi:10.1128/AAC.46.7.2303.
- Argudín, M. A., Deplano, A., Meghraoui, A., Dodémont, M., Heinrichs, A., Denis, O., et al. (2017). Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. *Antibiotics* 6, 1–38. doi:10.3390/antibiotics6020012.
- Arisoy, M., Aysev, D., Ekim, M., Özel, D., Köse, S. K., Özsoy, E. D., et al. (2006). Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction. *Int. J. Clin. Pract.* 60, 170–173. doi:10.1111/j.1742-1241.2005.00668.x.
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., et al. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* 30, 108–160. doi:10.1039/c2np20085f.
- ASM (1995). Report of the ASM task force on antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7654082/>.
- Bae, I. K., Lee, Y. H., Jeong, H. J., Hong, S. G., Lee, S. H., and Jeong, S. H. (2008). A novel *bla*CTX-M-14 gene-harboring complex class 1 integron with an In4-like backbone structure from a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 340–342. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.06.006.
- Bajaj, P., Singh, N. S., Kanaujia, P. K., and Viridi, J. S. (2015). Distribution and molecular characterization of genes encoding CTX-M and AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 505, 350–356. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.09.084.
- Baltz, R. H., Miao, V., and Wrigley, S. K. (2005). Natural products to drugs: Daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 22, 717–741. doi:10.1039/b416648p.
- Barlow, M., and Hall, B. G. (2002). Phylogenetic analysis shows that the OXA β -lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J. Mol. Evol.* 55, 314–321. doi:10.1007/s00239-002-2328-y.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493–496. doi:10.1093/ajcp/45.4_ts.493.
- Belmar Campos, C., Fenner, I., Wiese, N., Lensing, C., Christner, M., Rohde, H., et al. (2014). Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany. *Int. J. Med.*

- Microbiol.* 304, 678–684. doi:10.1016/j.ijmm.2014.04.012.
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., et al. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int. J. Food Microbiol.* 203, 86–92. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023.
- Ben Yahia, H., Ben Sallem, R., Tayh, G., Klibi, N., Ben Amor, I., Gharsa, H., et al. (2018). Detection of CTX-M-15 harboring *Escherichia coli* isolated from wild birds in Tunisia. *BMC Microbiol.* 18, 1–8. doi:10.1186/s12866-018-1163-2.
- Berenbaum, M. C. (1978). A method for testing for synergy with any number of agents. *J. Infect. Dis.* 137, 122–130. doi:10.1093/infdis/137.2.122.
- Bielaszewska, M., Aldick, T., Bauwens, A., and Karch, H. (2014). Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Structure, transport, biological activity and putative role in virulence. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 521–529. doi:10.1016/j.ijmm.2014.05.005.
- Billard-Pomares, T., Fouteau, S., Jacquet, M. E., Roche, D., Barbe, V., Castellanos, M., et al. (2014). Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum β -lactamase from an *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6550–6557. doi:10.1128/AAC.03183-14.
- Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R. A., Schets, F. M., and De Husman, A. M. R. (2015). Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in dutch surface water and wastewater. *PLoS One* 10, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0127752.
- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1–14. doi:10.1128/AAC.48.1.1-14.2004.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., and 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. doi:10.1093/jac/dkx327.
- Boswihi, S. S., Udo, E. E., Mathew, B., Noronha, B., Verghese, T., and Tappa, S. B. (2020). Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Patients Admitted to Kuwait Hospitals in 2016–2017. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2019.02912.
- Bou, G., Vila, J., Seral, C., and Castillo, F. J. (2014). Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 32, 24–32. doi:10.1016/S0213-005X(14)70171-5.
- Branger, C., Zamfir, O., Geoffroy, S., Laurans, G., Arlet, G., Vu Thien, H., et al. (2005). Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum β -lactamase type. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 54–61. doi:10.3201/eid1101.040257.
- Brooks, B. D., and Brooks, A. E. (2014). Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 78, 14–27. doi:10.1016/j.addr.2014.10.027.
- Brouwer, C. P. J. M., Rahman, M., and Welling, M. M. (2011). Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use. *Peptides* 32, 1953–1963. doi:10.1016/j.peptides.2011.07.017.

- Brown, E. E. F., Cooper, A., Carrillo, C., and Blais, B. (2019). Selection of multidrug-resistant bacteria in medicated animal feeds. *Front. Microbiol.* 10, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2019.00456.
- Brown, P., and Dawson, M. J. (2015). A perspective on the next generation of antibacterial agents derived by manipulation of natural products. 1st ed. Elsevier B.V. doi:10.1016/bs.pmch.2014.10.001.
- Bugli, F., Posteraro, B., Papi, M., Torelli, R., Maiorana, A., Sterbini, F. P., et al. (2013). In vitro interaction between alginate lyase and amphotericin B against *Aspergillus fumigatus* biofilm determined by different methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1275–1282. doi:10.1128/AAC.01875-12.
- Bürgmann, H., Frigon, D., Gaze, W. H., Manaia, C. M., Pruden, A., Singer, A. C., et al. (2018). Water and sanitation: An essential battlefront in the war on antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, 1–14. doi:10.1093/femsec/fiy101.
- Burns, E. E., Carter, L. J., Snape, J., Thomas-Oates, J., and Boxall, A. B. A. (2018). Application of prioritization approaches to optimize environmental monitoring and testing of pharmaceuticals. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* 21, 115–141. doi:10.1080/10937404.2018.1465873.
- Bush, K., and Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969–976. doi:10.1128/AAC.01009-09.
- Calbo, E., Freixas, N., Xercavins, M., Riera, M., Nicolás, C., Monistrol, O., et al. (2011). Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and control. *Clin. Infect. Dis.* 52, 743–749. doi:10.1093/cid/ciq238.
- Calhau, V., Mendes, C., Pena, A., Mendonça, N., and Da Silva, G. J. (2015). Virulence and plasmidic resistance determinants of *Escherichia coli* isolated from municipal and hospital wastewater treatment plants. *J. Water Health* 13, 311–318. doi:10.2166/wh.2014.327.
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., et al. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* 22, 1–5. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589.
- Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I. Z., Gomes, T. A. T., et al. (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.* 10, 161. doi:10.1186/1471-2180-10-161.
- Carvalhoes, C. G., Cayô, R., Assis, D. M., Martins, E. R., Juliano, L., Juliano, M. A., et al. (2013). Detection of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and class D β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 51, 287–290. doi:10.1128/JCM.02365-12.
- Carvalhoes, C. G., Da Silva, A. C. R., Streling, A. P., Cayô, R., Rockstroh, A. C., Machado, A. M. O., et al. (2015). Detection of carbapenemase activity using VITEK MS: Interplay of carbapenemase type and period of incubation. *J. Med. Microbiol.* 64, 946–947. doi:10.1099/jmm.0.000102.

- CDC (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers Dis. Control Prev.*, 1–113. doi:10.15620/cdc:82532.
- Cederlund, A., Gudmundsson, G. H., and Agerberth, B. (2011). Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* 278, 3942–3951. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08302.x.
- Chan, C., Burrows, L. L., and Deber, C. M. (2005). Alginate as an auxiliary bacterial membrane: Binding of membrane-active peptides by polysaccharides. *J. Pept. Res.* 65, 343–351. doi:10.1111/j.1399-3011.2005.00217.x.
- Chang, S. (2003). Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *N. Engl. J. Med.* 14, 348. doi:10.1056/NEJMoa025025.
- Chapman, T. A., Wu, X. Y., Barchia, I., Bettelheim, K. A., Driesen, S., Trott, D., et al. (2006). Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4782–4795. doi:10.1128/AEM.02885-05.
- Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y.-F., Yannarell, A. C., et al. (2009). Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. *J. Environ. Qual.* 38, 1086–1108. doi:10.2134/jeq2008.0128.
- Chen, Y. M. M., Wright, P. J., Lee, C. S., and Browning, G. F. (2003). Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Vet. Microbiol.* 94, 57–69. doi:10.1016/S0378-1135(03)00063-4.
- Cheng, C., Sun, J., Zheng, F., Lu, W., Yang, Q., and Rui, Y. (2016). New structures simultaneously harboring class 1 integron and ISCR1-linked resistance genes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Microbiol.* 16, 1–7. doi:10.1186/s12866-016-0683-x.
- Cirioni, O., Ghiselli, R., Orlando, F., Silvestri, C., Mocchegiani, F., Rocchi, M., et al. (2007). Efficacy of colistin/rifampin combination in experimental rat models of sepsis due to a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Crit. Care Med.* 35, 1717–1723. doi:10.1097/01.CCM.0000266685.25436.03.
- Citorik, R. J., Mimee, M., and Lu, T. K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat. Biotechnol.* 32, 1141–1145. doi:10.1038/nbt.3011.
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., and Wolk, D. M. (2013). Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 547–603. doi:10.1128/CMR.00072-12.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558. doi:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.
- Clermont, O., Gordon, D. M., Brisse, S., Walk, S. T., and Denamur, E. (2011). Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: Rapid identification and prevalence. *Environ. Microbiol.* 13, 2468–2477. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., and Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection

- of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019.
- CLSI (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 28th Edition. Wayne, PA: CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colom, K., Pérez, J., Alonso, R., Fernández-Aranguiz, A., Lariño, E., and Cisterna, R. (2003). Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*OXA-1 genes in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 147–152. doi:10.1016/S0378-1097(03)00306-9.
- Connell, H., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Mårild, S., and Svanborg, C. (1996). Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9827–9832. doi:10.1073/pnas.93.18.9827.
- Coque, T. M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., et al. (2008). Dissemination of clonally related *E.coli* strains expressing ESBL CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 195–200. doi:10.3201/eid1402.070350.
- Cornaglia, G., Lönnroth, A., and Struelens, M. (2004). Report from the European conference on the Role of Research in Combating Antibiotic Resistance, 2003. In *Clinical Microbiology and Infection* (Blackwell Publishing Ltd), 473–497. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00907.x.
- Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M. J., Lito, L. M., Cristino, J. M., et al. (2003). Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2838–43. doi:10.1128/AAC.47.9.2838.
- Cortés, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, M., et al. (2010). Isolation and Characterization of Potentially Pathogenic Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Strains from Chicken and Pig Farms in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2799–2805. doi:10.1128/AEM.02421-09.
- Coura, F. M., Diniz, S. D. A., Silva, M. X., Mussi, J. M. S., Barbosa, S. M., Lage, A. P., et al. (2015). Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. *Sci. World J.* 2015, 1-4 doi:10.1155/2015/258424.
- Cullik, A., Pfeifer, Y., Prager, R., Von Baum, H., and Witte, W. (2010). A novel IS26 structure surrounds *bla*CTX-M genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *J. Med. Microbiol.* 59, 580–587. doi:10.1099/jmm.0.016188-0.
- Cursino, L., Šmajš, D., Šmarda, J., Nardi, R. M. D., Nicoli, J. R., Chartone-Souza, E., et al. (2006). Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both *in vitro* and *in vivo*. *J. Appl. Microbiol.* 100, 821–829. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02834.x.
- Dabour, N., Zihler, A., Kheadr, E., Lacroix, C., and Fliss, I. (2009). *In vivo* study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 225–233. doi:10.1016/j.jfoodmicro.2009.05.005.
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., and Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front. Microbiol.* 7, 1–17. doi:10.3389/fmicb.2016.01831.
- Dekker, J. P., and Branda, J. A. (2011). MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin. Microbiol. Newsl.* 33, 87–93.

- doi:10.1016/j.clinmicnews.2011.05.003.
- Demirev, P. A., Hagan, N. S., Antoine, M. D., Lin, J. S., and Feldman, A. B. (2013). Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24, 1194–1201. doi:10.1007/s13361-013-0609-x.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., et al. (2015). Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14, 1–11. doi:10.1186/s12941-015-0100-6.
- Derbyshire, H., Kay, G., Evans, K., Vaughan, C., Kavuri, U., and Winstanley, T. (2009). A simple disc diffusion method for detecting AmpC and extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 497–501. doi:10.1093/jac/dkn535.
- Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., and Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* 30, 1562–1574. doi:10.1016/j.peptides.2009.05.014.
- Diestra, K., Juan, C., Curiao, T., Moya, B., Miro, E., Oteo, J., et al. (2008). Characterization of plasmids encoding blaESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 60–66. doi:10.1093/jac/dkn453.
- Doi, Y., Hazen, T. H., Boitano, M., Tsai, Y. C., Clark, T. A., Korch, J., et al. (2014). Whole-genome assembly of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 carbapenemases using single-molecule, real-time sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5947–5953. doi:10.1128/AAC.03180-14.
- Dorado-García, A., Smid, J. H., van Pelt, W., Bonten, M. J. M., Fluit, A. C., van den Bunt, G., et al. (2018). Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 339–347. doi:10.1093/jac/dkx397.
- Dortet, L., Agathine, A., Naas, T., Cuzon, G., Poirel, L., and Nordmann, P. (2015). Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 3014–3022. doi:10.1093/jac/dkv213.
- Dortet, L., Tandé, D., De Briel, D., Bernabeu, S., Lasserre, C., Gregorowicz, G., et al. (2018). MALDI-TOF for the rapid detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae: Comparison of the commercialized MBT STAR® -carba IVD kit with two in-house MALDI-TOF techniques and the RAPIDEC® CARBA NP. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 2352–2359. doi:10.1093/jac/dky209.
- Doudi, M., Naghsh, N., and Setorki, M. (2013). Comparison of the effects of silver nanoparticles on pathogenic bacteria resistant to beta-lactam antibiotics (ESBLs) as a prokaryote model and Wistar rats as a eukaryote model. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 19, 103–110. doi:10.12659/MSMBR.883835.
- EAHC (2013). Study on the environmental risks of medicinal products. *Bio Intell. Serv.*, 310.
- Earnshaw, S., Mancarella, G., Mendez, A., Todorova, B., Magiorakos, A. P., Possenti, E., et al. (2014). European antibiotic awareness day: A five-year perspective of Europe-Wide actions to promote prudent use of antibiotics. *Eurosurveillance* 19, 20928.

doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.41.20928.

ECDC/EFSA/EMA (2015). ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA J.* 13, 1–114. doi:10.2903/j.efsa.2015.4006.

ECDC/EFSA/EMA (2017). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis. *EFSA J.* 15. doi:10.2903/j.efsa.2017.4872.

ECDC/EMA (2009). The bacterial challenge : time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. EMEA/576176/2009.

ECDC (2012). Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. doi:10.2807/ese.17.46.20316-en.

ECDC (2019). Antimicrobial resistance in the EU in 2019. *Vet. Rec.* 174, 341. doi:10.1136/vr.g2500.

ECDC (2020). Antimicrobial consumption in the EU/EEA – Annual Epidemiological Report 2019. 1–25.

Eckert, C., Gautier, V., and Arlet, G. (2006). DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*CTX-M genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 14–23. doi:10.1093/jac/dki398.

EFSA (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10, 1–10. doi:10.2903/j.efsa.2012.2740

EFSA (2018a). Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. *EFSA J.* 16, 95. doi:10.2903/j.efsa.2018.5327.

EFSA (2018b). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J.* 16, 1–24. doi:10.2903/j.efsa.2018.5206.

EFSA (2020). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA J.* 18. doi:10.2903/j.efsa.2020.6007.

Eliopoulos, G. M., and Moellering, R. C. (1982). Antibiotic Synergism and Antimicrobial Combinations in Clinical Infections. *Rev. Infect. Dis.* 4, 282–293. doi:https://www.jstor.org/stable/4452720.

EMA (2017). Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. (EMA/184855/2017).

EMA (2020). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018: Trends from 2010-2018. *Ninth ESVAC Rep. - EMA/294674/2019*, 106. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2017_en.pdf.

Escobar-Páramo, P., Sabbagh, A., Darlu, P., Pradillon, O., Vaury, C., Denamur, E., et al.

- (2004). Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: The *Escherichia coli* case study. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30, 243–250. doi:10.1016/S1055-7903(03)00181-7.
- EU (1991). Directive 91/271/ECC sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Diario oficial de la Unión Europea L135.
- EUCAST (2018). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>.
- Ewers, C., Bethe, A., Stamm, I., Grobbel, M., Kopp, P. A., Guerra, B., et al. (2014). CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: Another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence? *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1224–1230. doi:10.1093/jac/dkt516.
- Fabbri, A., Travaglione, S., and Fiorentini, C. (2010). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): Toxin biology, *in vivo* applications and therapeutic potential. *Toxins (Basel)*. 2, 283–296. doi:10.3390/toxins2020282.
- Falagas, M. E., and Karageorgopoulos, D. E. (2009). Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. *J. Hosp. Infect.* 73, 345–354. doi:10.1016/j.jhin.2009.02.021.
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., and Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev. Chil. infectología* 33, 438–450. doi:10.4067/s0716-10182016000400009.
- Féria, C., Machado, J., Correia, J. D., Gonçalves, J., and Gaastra, W. (2001). Distribution of *papG* alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 205–208. doi:10.1016/S0378-1097(01)00310-X.
- Fernández-Reyes, M., Vicente, D., Gomariz, M., Esnal, O., Landa, J., Oñate, E., et al. (2014). High rate of fecal carriage of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in healthy children in Gipuzkoa, northern Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1822–1824. doi:10.1128/AAC.01503-13.
- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., González-Ávila, M., Cembrero-Fuciños, D., Herrero-Hernández, A., González-Buitrago, J. M., et al. (2010). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2110–2115. doi:10.1128/JCM.02215-09.
- Ferrer-Espada, R. (2016). Potenciación de antibióticos, inhibidores de betalactamasas y bombas de expulsión mediante péptidos antimicrobianos en bacterias gramnegativas multirresistentes. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. doi:10.5354/0717-8883.1986.23781.
- Fijan, S. (2016). Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. *Probiotics Prebiotics Hum. Nutr. Heal.* 10, 1-17, doi:10.5772/63141.
- Finch, R., and Hunter, P. A. (2006). Antibiotic resistance - Action to promote new technologies: Report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK, 12-13 December 2005. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 12–13. doi:10.1093/jac/dkl373.
- Findlay, J., Hopkins, K. L., Meunier, D., and Woodford, N. (2014). Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1338–1342.

doi:10.1093/jac/dku571.

- Fisher, J., and Mobashery, S. (2009). Three Decades of the Class A β -Lactamase Acyl-Enzyme. *Curr. Protein Pept. Sci.* 10, 401–407. doi:10.2174/138920309789351967.
- Flores, C. Y., Diaz, C., Rubert, A., Benítez, G. A., Moreno, M. S., Fernández Lorenzo de Mele, M. A., et al. (2010). Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO₂ surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interface Sci.* 350, 402–408. doi:10.1016/j.jcis.2010.06.052.
- Flühe, L., and Marahiel, M. A. (2013). Radical S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 605–612. doi:10.1016/j.cbpa.2013.06.031.
- Fluit, A. C., and Schmitz, F. J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 272–288. doi:10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x.
- Fondevila, M., Herrero, R., Casallas, M. C., Abecia, L., and Duchá, J. J. (2009). Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150, 259–269. doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.09.003.
- Fondevila, M. (2010). Potential Use of Silver Nanoparticles as an Additive in Animal Feeding. *Silver Nanoparticles*. 10, 1-17. doi:10.5772/8509.
- Founou, R. C., Founou, L. L., and Essack, S. Y. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 12, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0189621.
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., et al. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* 20, 8856–8874. doi:10.3390/molecules20058856.
- Franciczek, R., and Krzyzanowska, B. (2014). ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from bloodstream infections - Antimicrobial susceptibility, conjugative transfer of resistance genes and phylogenetic origin. *Adv. Clin. Exp. Med.* 23, 865–870. doi:10.17219/acem/37328.
- Galani, I., Souli, M., Koratzanis, E., Chryssouli, Z., and Giamarellou, H. (2006). Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo- β -lactamase VIM-2 and extended-spectrum β -lactamase GES-7: Identification of the In8 integron carrying the *bla*VIM-2 gene. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 432–433. doi:10.1093/jac/dkl240.
- Gales, A. C., Jones, R. N., and Sader, H. S. (2006). Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 315–321. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01351.x.
- Galler, H., Feierl, G., Petternel, C., Reinthaler, F. F., Haas, D., Habib, J., et al. (2018). Multiresistant bacteria isolated from activated sludge in Austria. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 1-11. doi:10.3390/ijerph15030479.
- García-Galán, M. J., Díaz-Cruz, M. S., and Barceló, D. (2011). Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basin. Removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. *Environ. Int.* 37, 462–473. doi:10.1016/j.envint.2010.11.011.

- García-Migura, L., Hendriksen, R. S., Fraile, L., and Aarestrup, F. M. (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 170, 1–9. doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.013.
- Gieraltowski, L., Higa, J., Peralta, V., Green, A., Schwensohn, C., Rosen, H., et al. (2016). National outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry company. *PLoS One* 11, 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0162369.
- Gifford, J. L., Hunter, H. N., and Vogel, H. J. (2005). Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2588–2598. doi:10.1007/s00018-005-5373-z.
- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., and Zhu, Y. G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 9, 1269–1279. doi:10.1038/ismej.2014.226.
- Goldstein, C., Lee, M. D., Sanchez, S., Phillips, B., Register, B., Grady, M., et al. (2001). Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 723–726. doi:10.1128/AAC.45.3.723.
- Gonçalves, A., Torres, C., Silva, N., Carneiro, C., Radhouani, H., Coelho, C., et al. (2010). Genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a portuguese intensive swine farm. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 1569–1573. doi:10.1089/fpd.2010.0598.
- González-Martínez, B. (2003). Bacteriocinas de Probióticos. *Rev. salud pública y Nutr.* 4, 9. doi://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/108.
- González, D., Gallagher, E., Zúñiga, T., Leiva, J., and Vitas, A. I. (2019). Prevalence and characterization of β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy human carriers. *Int. Microbiol.* 23,1-7. doi:10.1007/s10123-019-00087-z.
- Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., et al. (2005). Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 289–297. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.010.
- Griffin, P. M., Manges, A. R., and Johnson, J. R. (2012). Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin. Infect. Dis.* 55, 712–719. doi:10.1093/cid/cis502.
- Griggs, J. P. (2005). Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *J. Appl. Poult. Res.* 14, 750–756. doi:10.1093/japr/14.4.750.
- Grove, T. L., Himes, P. M., Hwang, S., Yumerefendi, H., Bonanno, J. B., Kuhlman, B., et al. (2017). Structural Insights into Thioether Bond Formation in the Biosynthesis of Sactipeptides. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 11734–11744. doi:10.1021/jacs.7b01283.
- Guo, M. T., Yuan, Q. Bin, and Yang, J. (2013). Microbial selectivity of UV treatment on antibiotic-resistant heterotrophic bacteria in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 47, 6388–6394. doi:10.1016/j.watres.2013.08.012.
- Guo, S. Y., Wakeham, D., Brouwers, H. J. M., Cobbold, R. N., Abraham, S., Mollinger, J. L., et al. (2015). Human-associated fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clonal lineages, including ST354, isolated from canine feces and extraintestinal infections in Australia.

- Microbes Infect.* 17, 266–274. doi:10.1016/j.micinf.2014.12.016.
- Guyonnet, J., Manco, B., Baduel, L., Kaltsatos, V., Aliabadi, M. H. F. S., and Lees, P. (2010). Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of G.I.T. disease in pigs. *Res. Vet. Sci.* 88, 307–314. doi:10.1016/j.rvsc.2009.09.001.
- Haider, N., Rothman-Ostrow, P., Osman, A. Y., Arruda, L. B., Macfarlane-Berry, L., Elton, L., et al. (2020). COVID-19—Zoonosis or Emerging Infectious Disease? *Front. Public Heal.* 1-8. doi:10.3389/fpubh.2020.596944.
- Hall, R. M., and Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 15, 593–600. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02368.x.
- Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C., and Fliss, I. (2013). Anti-infective properties of bacteriocins: An update. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 2947–2967. doi:10.1007/s00018-012-1202-3.
- Hausner, M., and Wuertz, S. (1999). High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by Quantitative In Situ Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3710–3713.
- Haversen, L. A., Engberg, I., Baltzer, L., Dolphin, G., Hanson, L. A., and Mattsby-Baltzer, I. (2000). Human lactoferrin and peptides derived from a surface-exposed helical region reduce experimental *Escherichia coli* urinary tract infection in mice. *Infect. Immun.* 68, 5816–5823. doi:10.1128/IAI.68.10.5816-5823.2000.
- Hegemann, J. D., Zimmermann, M., Xie, X., and Marahiel, M. A. (2015). Lasso Peptides: An Intriguing Class of Bacterial Natural Products. *Acc. Chem. Res.* 48, 1909–1919. doi:10.1021/acs.accounts.5b00156.
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E. T., and Schwartz, T. (2017). Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Front. Microbiol.* 8, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2017.01282.
- Hernandez, S., Tsang, T., and Handelsman, J. (2017). SMALL WORLD INITIATIVE : Guía de laboratorio para la exploración.
- Hernández Torres, A., García Vázquez, E., Yagüe, G., and Gómez Gómez, J. (2010). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: Situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev. Esp. Quimioter.* 23, 12–19.
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M., and Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 6175–6181. doi:10.1128/jb.172.11.6175-6181.1990.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
- Holmer, I., Salomonsen, C. M., Jorsal, S. E., Astrup, L. B., Jensen, V. F., Høg, B. B., et al. (2019). Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage. *BMC Vet. Res.* 15, 1–13. doi:10.1186/s12917-019-2162-8.

- Hrabák, J., Walková, R., Študentová, V., Chudáčková, E., and Bergerová, T. (2011). Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3222–3227. doi:10.1128/JCM.00984-11.
- Hrabák, J., Študentová, V., Walková, R., Žemličková, H., Jakubů, V., Chudáčková, E., et al. (2012). Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2441–2443. doi:10.1128/JCM.01002-12.
- Hrabák, J., Chudáčková, E., and Walková, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDITOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: From research to routine diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 103–114. doi:10.1128/CMR.00058-12.
- Hussain, A., Shaik, S., Ranjan, A., Suresh, A., Sarker, N., Semmler, T., et al. (2019). Genomic and Functional Characterization of Poultry *Escherichia coli* From India Revealed Diverse Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Lineages With Shared Virulence Profiles. *Front. Microbiol.* 10, 1-12. doi:10.3389/fmicb.2019.02766.
- ISO (2007). Calidad del agua. Muestreo para el análisis microbiológico. International Standard ISO 19458:2007.
- ISO (2012). Calidad del agua. Muestreo Parte 3: Conservación y manipulación de las muestras de agua. International Standard ISO 5667-3:2012.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 161–182. doi:10.1128/CMR.00036-08.
- Jäger, T., Hembach, N., Elpers, C., Wieland, A., Alexander, J., Hiller, C., et al. (2018). Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment. *Front. Microbiol.* 9, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2018.02599.
- Jakovljevic, M., Bjedov, S., Jaksic, N., and Jakovljevic, I. (2020). Covid-19 pandemia and public and global mental health from the perspective of global health security. *Psychiatr. Danub.* 32, 6–14. doi:10.24869/psyd.2020.6.
- Jalali, H. R., Pourbakhsh, A., Fallah, F., and Eslami, G. (2015). Genotyping of Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* by PCR. *Nov. Biomed.* 3, 177–181. doi:10.22037/nbm.v3i4.8036.
- Jamborova, I., Dolejska, M., Vojtech, J., Guenther, S., Uricariu, R., Drozdowska, J., et al. (2015). Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 648–657. doi:10.1128/AEM.02459-14.
- Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G., and Philippon, A. (1988). Extended Broad-Spectrum β -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer β -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10, 1-12. doi:https://www.jstor.org/stable/4454571.
- Jia, S., Bian, K., Shi, P., Ye, L., and Liu, C. H. (2020). Metagenomic profiling of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community during multiple disinfection regimes in a full-scale drinking water treatment plant. *Water Res.* 176, 115721. doi:10.1016/j.watres.2020.115721.

- Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M., and Stell, A. L. (2001). Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 183, 78–88. doi:10.1086/317656.
- Johnson, J. R., and Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*.” *J. Lab. Clin. Med.* 139, 155–162. doi:10.1067/mlc.2002.121550.
- Johnson, J. R., Johnston, B. D., and Gordon, M. (2017). Rapid and Specific Detection of the *Escherichia coli* Sequence Type 648 Complex within Phylogroup F. *J. Clin. Microbiol.* 55, 1116–1121. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01254.
- Kaczmarek, A., Skowron, K., Budzyńska, A., and Gospodarek-Komkowska, E. (2018). Virulence-associated genes and antibiotic susceptibility among vaginal and rectal *Escherichia coli* isolates from healthy pregnant women in Poland. *Folia Microbiol. (Praha)*. 63, 637–643. doi:10.1007/s12223-018-0598-z.
- Kang, S. J., Kim, D. H., Mishig-Ochir, T., and Lee, B. J. (2012). Antimicrobial peptides: Their physicochemical properties and therapeutic application. *Arch. Pharm. Res.* 35, 409–413. doi:10.1007/s12272-012-0302-9.
- Kannan, K., and Mankin, A. S. (2011). Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: Species-specific binding and action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1241, 33–47. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06315.x.
- Kar, D., Bandyopadhyay, S., Dimri, U., Mondal, D. B., Nanda, P. K., Das, A. K., et al. (2016). Antibacterial effect of silver nanoparticles and capsaicin against MDR-ESBL producing *Escherichia coli*: An in vitro study. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 6, 807–810. doi:10.1016/S2222-1808(16)61135-0.
- Karami, N., Wold, A. E., and Adlerberth, I. (2017). Antibiotic resistance is linked to carriage of *papC* and *iutA* virulence genes and phylogenetic group D background in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* from infants and young children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 721–729. doi:10.1007/s10096-016-2854-y.
- Kargar, M., Mohammadalipour, Z., Doosti, A., Lorzadeh, S., and Japoni-Nejad, A. (2014). High prevalence of class 1 to 3 integrons among multidrug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in southwest of Iran. *Osong Public Heal. Res. Perspect.* 5, 193–198. doi:10.1016/j.phrp.2014.06.003.
- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R. K., Viridi, J. S., and Gulati, P. (2018). Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 167–176. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004.
- Kiiru, J., Butaye, P., Goddeeris, B. M., and Kariuki, S. (2013). Analysis for prevalence and physical linkages amongst integrons, ISEcp1, ISCR 1, Tn21 and Tn7 encountered in *Escherichia coli* strains from hospitalized and non-hospitalized patients in Kenya during a 19-year period (1992 – 2011). *BMC Microbiol.* 13, 109–123. doi:10.1186/1471-2180-13-109.
- Kim, J., Bae, I. K., Jeong, S. H., Chang, C. L., Lee, C. H., and Lee, K. (2011). Characterization of IncF plasmids carrying the *bla*CTX-M-14 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1263–1268. doi:10.1093/jac/dkr106.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 3, 95–101.

- doi:10.1016/j.nano.2006.12.001.
- Kim, Y. J., Moon, J. S., Oh, D. H., Chon, J. W., Song, B. R., Lim, J. S., et al. (2018). Genotypic characterization of ESBL-producing *E. coli* from imported meat in South Korea. *Food Res. Int.* 107, 158–164. doi:10.1016/j.foodres.2017.12.023.
- Klümper, U., Dechesne, A., and Smets, B. F. (2014). Protocol for Evaluating the Permissiveness of Bacterial Communities Toward Conjugal Plasmids by Quantification and Isolation of Transconjugants. *Hydrocarb. Lipid Microbiol. Protoc.*, pp 275-288.
- Knox, J., Jadhav, S., Sevir, D., Agyekum, A., Whipp, M., Waring, L., et al. (2014). Phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by use of matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry and the carba NP test. *J. Clin. Microbiol.* 52, 4075–4077. doi:10.1128/JCM.02121-14.
- Komatsu, M., Aihara, M., Shimakawa, K., Iwasaki, M., Nagasaka, Y., Fukuda, S., et al. (2003). Evaluation of MicroScan ESBL confirmation panel for Enterobacteriaceae-producing, extended-spectrum β -lactamases isolated in Japan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46, 125–130. doi:10.1016/S0732-8893(03)00041-5.
- Kondratyeva, K., Salmon-Divon, M., and Navon-Venezia, S. (2020). Meta-analysis of Pandemic *Escherichia coli* ST131 Plasmidome Proves Restricted Plasmid-clade Associations. *Sci. Rep.* 10, 1–11. doi:10.1038/s41598-019-56763-7.
- Kor, S. B., Choo, Q. C., and Chew, C. H. (2013). New integron gene arrays from multiresistant clinical isolates of members of the Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* from hospitals in Malaysia. *J. Med. Microbiol.* 62, 412–420. doi:10.1099/jmm.0.053645-0.
- Kristich CJ, Rice, LB et al (2014). Enterococcal Infection– Treatment and Antibiotic Resistance. *Enterococci From Commensals to Lead. Causes Drug Resist. Infect.* 6, 123–185.
- Kumar, M., Sarma, D. K., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Nina, P. B., et al. (2021). Futuristic Non-antibiotic Therapies to Combat Antibiotic Resistance: A Review. *Front. Microbiol.* 12, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2021.609459.
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., and Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microb. Pathog.* 128, 171–177. doi:10.1016/j.micpath.2019.01.002.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 311–320. doi:10.1093/jac/dkh325.
- Küster, A., and Adler, N. (2014). Pharmaceuticals in the environment: Scientific evidence of risks and its regulation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 1-8. doi:10.1098/rstb.2013.0587.
- Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., del Turrent, L. C. I., and Padilla, C. R. (2010). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 615–621. doi:10.1007/s11274-009-0211-3.
- Lasserre, C., De Martin, L. Saint, Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., et al. (2015). Efficient detection of carbapenemase activity in enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2163–2171. doi:10.1128/JCM.03467-14.

- Lata, P., Ram, S., and Shanker, R. (2016). Multiplex PCR based genotypic characterization of pathogenic vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* recovered from an Indian river along a city landscape. *Springerplus* 5. doi:10.1186/s40064-016-2870-5.
- Leonard, A. F. C., Zhang, L., Balfour, A. J., Garside, R., and Gaze, W. H. (2015). Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environ. Int.* 82, 92–100. doi:10.1016/j.envint.2015.02.013.
- Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., van den Munckhof, M. P., van Essen-Zandbergen, A., et al. (2011). Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 873–880. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x.
- Li, J., Nation, R. L., Milne, R. W., Turnidge, J. D., and Coulthard, K. (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 11–25. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.10.001.
- Liao, X. P., Xia, J., Yang, L., Li, L., Sun, J., Liu, Y. H., et al. (2015). Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals. *Front. Microbiol.* 6, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2015.01136.
- Liu, X. J., Lyu, Y., Li, Y., Xue, F., and Liu, J. (2017). Trends in antimicrobial resistance against enterobacteriaceae strains isolated from blood: A 10-year epidemiological study in mainland China (2004–2014). *Chin. Med. J. (Engl.)* 130, 2050–2055. doi:10.4103/0366-6999.213407.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., et al. (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. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Ljungh, Å., and Wadström, T. (2001). Lactic Acid Bacteria as Probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7, 73–90.
- Lohans, CT, and Vederas, JC. (2014). Structural characterization of thioether-bridged bacteriocins. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 67, 23–30. doi:10.1038/ja.2013.81.
- Loo, Y. Y., Rukayadi, Y., Nor-Khaizura, M. A. R., Kuan, C. H., Chieng, B. W., Nishibuchi, M., et al. (2018). *In vitro* antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* 9, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2018.01555.
- López-Goñi, I. (2020). Preparados para la próxima pandemia. *Editor. planeta*. Available at: <https://www.planetadelibros.com/libro-preparados-para-la-proxima-pandemia/321159>.
- Lopez, F. E., Vincent, P. A., Zenoff, A. M., Salomón, R. A., and Farías, R. N. (2007). Efficacy of microcin J25 in biomatrices and in a mouse model of *Salmonella* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 676–680. doi:10.1093/jac/dkm009.
- López, J., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, J., Medina, E., Martínez, M., et al. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: Una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 39, 49–57.
- López Martínez, A. (2018). Evaluación de tecnologías en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs, para la reducción de Microorganismos con riesgo sanitario y ambiental. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, España, 2018

- Lozano, C., González-Barrio, D., García, J. T., Ceballos, S., Olea, P. P., Ruiz-Fons, F., et al. (2015). Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* ST6-*vanB2* and *E. faecium* ST915-*vanA* in faecal samples of wild *Rattus rattus* in Spain. *Vet. Microbiol.* 177, 168–174. doi:10.1016/j.vetmic.2015.02.025.
- Lozano, C., Gonzalez-Barrio, D., Camacho, M. C., Lima-Barbero, J. F., de la Puente, J., Höfle, U., et al. (2016). Characterization of fecal vancomycin-resistant enterococci with acquired and intrinsic resistance mechanisms in wild animals, Spain. *Microb. Ecol.* 72, 813–820. doi:10.1007/s00248-015-0648-x.
- Luo, C., Walk, S. T., Gordon, D. M., Feldgarden, M., Tiedje, J. M., and Konstantinidis, K. T. (2011). Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7200–7205. doi:10.1073/pnas.1015622108.
- Lüthje, P., and Brauner, A. (2014). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. *Adv. Microb. Physiol.* 65, 337–372. doi:10.1016/bs.ampbs.2014.08.006.
- Machado, E., Canto, R., Baquero, F., Gala, J., and Coque, T. M. (2005). Integron Content of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob. agents chemotherapy* 49, 1823–1829. doi:10.1128/AAC.49.5.1823.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Sousa, J. C., and Peixe, L. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 296–302. doi:10.1093/jac/dkn179.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Mahillon, J., and Chandler, M. (1998). Insertion sequences. *Microbiology Mol. Biol. Rev.* 62, 725–74. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00799-3.
- Makowska, N., Philips, A., Dabert, M., Nowis, K., Trzebny, A., Koczura, R., et al. (2020). Metagenomic analysis of β -lactamase and carbapenemase genes in the wastewater resistome. *Water Res.* 170, 11, 1-13. doi:10.1016/j.watres.2019.115277.
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., and Pitout, J. D. D. (2019). Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clin. Microbiol. Rev.* 32, 1–25. doi:10.1128/CMR.00135-18.
- MAPAMA (2017). Guía de prescripción de antibióticos en avicultura de puesta. *Minist. Agric. y Pesca Aliment. y Medio Ambient.*, 35. Available at: <https://www.nutricionsostenible.com/wp-content/uploads/2017/02/GUIA-DE-PRESCRIPCION-AVICULTURA-PUESTA-2017.pdf>.
- Marambio-Jones, C., and Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanoparticle Res.* 12, 1531–1551. doi:10.1007/s11051-010-9900-y.
- March-Rosselló, G. A. (2017). Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics.

- Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* 35, 182–188. doi:10.1016/j.eimce.2017.02.007.
- Martinez de Tejada, G., Sanchez-Gomez, S., Razquin-Olazarán, I., Kowalski, I., Kaconis, Y., Heinbockel, L., et al. (2012). Bacterial Cell Wall Compounds as Promising Targets of Antimicrobial Agents I. Antimicrobial Peptides and Lipopolyamines. *Curr. Drug Targets* 13, 1121–1130. doi:10.2174/138945012802002410.
- Massot, M., Daubié, A. S., Clermont, O., Jauréguy, F., Couffignal, C., Dahbi, G., et al. (2016). Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiol. (United Kingdom)* 162, 642–650. doi:10.1099/mic.0.000242.
- Mathers, A. J., Peirano, G., and Pitout, J. D. D. (2015). *Escherichia coli* ST131: The Quintessential Example of an International Multiresistant High-Risk Clone. Elsevier Ltd doi:10.1016/bs.aambs.2014.09.002.
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. ., and Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1568–1574. doi:10.1128/AAC.44.6.1568-1574.2000.Updated.
- McEneff, G., Barron, L., Kelleher, B., Paull, B., and Quinn, B. (2014). A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. *Sci. Total Environ.* 476–487, 1–10. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.123.
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., et al. (2016). Erratum for McGann et al., *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a novel IncF plasmid: First report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 5107. doi:10.1128/AAC.01353-16.
- McLain, J. E., Cytryn, E., Durso, L. M., and Young, S. (2016). Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *J. Environ. Qual.* 45, 432–440. doi:10.2134/jeq2015.06.0317.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., and Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 589–594. doi:10.1016/j.gde.2005.09.006.
- Mensa, J. (2014). Guía Terapéutica Antimicrobiana 2014. Available at: https://www.researchgate.net/publication/296638199_Guia_Terapeutica_Antimicrobiana_2014.
- Mercat, M., Clermont, O., Massot, M., Ruppe, E., De Garine-Wichatitsky, M., Miguel, E., et al. (2016). *Escherichia coli* population structure and antibiotic resistance at a buffalo/cattle interface in southern Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1459–1467. doi:10.1128/AEM.03771-15.
- Merino, I., Shaw, E., Horcajada, J. P., Cercenado, E., Mirelis, B., Pallarés, M. A., et al. (2016). CTX-M-15-H30Rx-ST131 subclone is one of the main causes of healthcare-associated ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia of urinary origin in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2125–2130. doi:10.1093/jac/dkw133.
- Millan, B., Castro, D., Araque, M., Ghiglione, B., and Gutkind, G. (2012). ISCR1 associated with *bla*CTX-M-1 y *bla*CTX-M-2 genes in IncN and IncFIIA plasmids isolated from

- Klebsiella pneumoniae* of nosocomial origin in Mérida, Venezuela. *Biomédica* 33, 268–75. doi:10.7705/biomedica.v33i2.774.
- Millán, Y., Hernández, E., Millán, B., and Araque, M. (2014). Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en mérida, Venezuela. *Rev. Argent. Microbiol.* 46, 175–181. doi:10.1016/S0325-7541(14)70069-0.
- Moles, S., Mosteo, R., Jairo, G., Szpunar, J., Gozzo, S., Castillo, J. R., et al. (2020). Towards the Removal of Antibiotics Detected in Wastewaters in the POCTEFA Territory: Occurrence. *Water* 1453, 1-12. doi:https://doi.org/10.3390/w12051453.
- Mondragón Preciado, G., Escalante Minakata, P., Osuna Castro, J., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J., Aguilar González, C., et al. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investig. Cienc.* 21, 64–70.
- Mora, A., López, C., Herrera, A., Viso, S., Mamani, R., Dhabi, G., et al. (2012). Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111: H4-D-ST2085 and O111: H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential. *Vet. Microbiol.* 156, 347–352. doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.033.
- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., et al. (2018). Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microb. Drug Resist.* 24, 747–767. doi:10.1089/mdr.2017.0392.
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., and Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol.* 1-10. doi:10.3389/fmicb.2019.00539.
- Müller, A., Stephan, R., and Nüesch-Inderbinen, M. (2016). Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Sci. Total Environ.* 541, 667–672. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.135.
- Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., et al. (2018). Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, 1–11. doi:10.1093/femsec/fiy057.
- Munir, M., Wong, K., and Xagorarakis, I. (2011). Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res.* 45, 681–693. doi:10.1016/j.watres.2010.08.033.
- Nakipoğlu, M., Yilmaz, F., and Içgen, B. (2017). *vanA* Gene Harboring Enterococcal and Non-enterococcal Isolates Expressing High Level Vancomycin and Teicoplanin Resistance Reservoirs in Surface Waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98, 712–719. doi:10.1007/s00128-016-1955-8.
- Navidinia, M. (2016). The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *J. Paramed. Sci.* 7, 43–57. doi:10.22037/jps.v7i3.12584.
- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., and Madec, J. Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 543–574. doi:10.1128/CMR.00125-13.
- Nordmann, P., Dortet, L., and Poirel, L. (2012). Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3016–3022. doi:10.1128/JCM.00859-12.

- Norman, A., Hansen, L. H., and Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2275–2289. doi:10.1098/rstb.2009.0037.
- Novais, Â., Cantón, R., Valverde, A., Machado, E., Galán, J. C., Peixe, L., et al. (2006). Dissemination and persistence of *bla*CTX-M-9 are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- α , and IncFI groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2741–2750. doi:10.1128/AAC.00274-06.
- O' Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. *Rev. Antimicrob. Resist.*, 1-20
- Odetoyin, B. W., Labar, A. S., Lamikanra, A., Aboderin, A. O., and Okeke, I. N. (2017). Classes 1 and 2 integrons in faecal *Escherichia coli* strains isolated from mother-child pairs in Nigeria. *PLoS One* 12, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0183383.
- OECD (2019). Pharmaceutical Residues in Freshwater Hazards and Policy Responses. *OECD Stud. Water*, 1–17. doi:https://doi.org/10.1787/c936f42d-en.
- Ojer-Usoz, E., González, D., Vitas, A. I., Leiva, J., García-Jalón, I., Febles-Casquero, A., et al. (2013). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Sci.* 93, 316–321. doi:10.1016/j.meatsci.2012.09.009.
- Ojer-Usoz, E., González, D., García-Jalón, I., and Vitas, A. I. (2014). High dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in effluents from wastewater treatment plants. *Water Res.* 56, 37–47. doi:10.1016/j.watres.2014.02.041.
- Ojer-Usoz, E., Gonzalez, D., and Vitas, A. I. (2015). Caracterización de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas en muestras alimentarias, ambientales y clínicas, Universidad de Navarra. Tesis doctoral.
- Ojer-Usoz, E., González, D., and Vitas, A. I. (2017). Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from environmental, human and food samples. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 10–12. doi:10.3390/ijerph14070676.
- Osińska, A., Harnisz, M., and Korzeniewska, E. (2016). Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 10818–10831. doi:10.1007/s11356-016-6221-4.
- Oteo, J., Diestra, K., Juan, C., Bautista, V., Novais, Â., Pérez-Vázquez, M., et al. (2009). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 173–176. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.03.006.
- Ovejero, C. M., Delgado-Blas, J. F., Calero-Caceres, W., Muniesa, M., and Gonzalez-Zorn, B. (2017). Spread of *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 1050–1053. doi:10.1093/jac/dkw533.
- Oviaño, M., Fernández, B., Fernández, A., Barba, M. J., Mouriño, C., and Bou, G. (2014). Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of

- flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 1146–1157. doi:10.1111/1469-0691.12729.
- Oviaño, M., Sparbier, K., Barba, M. J., Kostrzewa, M., and Bou, G. (2016). Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 655–660. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.08.024.
- Oviaño, M., Gómara, M., Barba, M. J., Revillo, M. J., Barbeyto, L. P., and Bou, G. (2017). Towards the early detection of β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2259–2262. doi:10.1093/jac/dkx127.
- Oviaño, M. B. (2019). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry for the Rapid Detection of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Beyond. *Clin. Microbiol. Newsl.* 32, 1–29.
- Ozgumus, O. B., Sandalli, C., Sevim, A., Celik-Sevim, E., and Sivri, N. (2009). Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. *J. Microbiol.* 47, 19–27. doi:10.1007/s12275-008-0206-z.
- Pacios, O., Blasco, L., Bleriot, I., Fernandez-Garcia, L., Bardanca, Mónica González Ambroa, A., López, M., et al. (2020). Strategies to Combat Multidrug-Resistant and Persistent Infectious Diseases. *Antibiotics* 9, 1–20. doi:10.3390/antibiotics9020065.
- Pallares-Vega, R., Blaak, H., van der Plaats, R., de Roda Husman, A. M., Hernandez Leal, L., van Loosdrecht, M. C. M., et al. (2019). Determinants of presence and removal of antibiotic resistance genes during WWTP treatment: A cross-sectional study. *Water Res.* 161, 319–328. doi:10.1016/j.watres.2019.05.100.
- Papagiannitsis, C. C., Študentová, V., Izdebski, R., Oikonomou, O., Pfeifer, Y., Petinaki, E., et al. (2015). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1731–1735. doi:10.1128/JCM.03094-14.
- Paterson, D. L., and Bonomo, R. A. (2005). Clinical Update Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657–686. doi:10.1128/CMR.18.4.657.
- Paulshus, E., Kühn, I., Möllby, R., Colque, P., O’Sullivan, K., Midtvedt, T., et al. (2019). Diversity and antibiotic resistance among *Escherichia coli* populations in hospital and community wastewater compared to wastewater at the receiving urban treatment plant. *Water Res.* 161, 232–241. doi:10.1016/j.watres.2019.05.102.
- Pérez-Etayo, L., Berzosa, M., González, D., and Vitas, A. I. (2018). Prevalence of integrons and insertion sequences in *esbl*-producing *E. coli* isolated from different sources in Navarra, Spain. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15. doi:10.3390/ijerph15102308.
- Pérez-Etayo, L., González, D., Leiva, J., and Vitas, A. I. (2020). Multidrug-resistant bacteria isolated from different aquatic environments in the North of Spain and South of France. *Microorganisms* 8, 1–25. doi:10.3390/microorganisms8091425.
- Pérez-Pérez, F. J., and Hanson, N. D. (2002). Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. 40, 2153–2162. doi:10.1128/JCM.40.6.2153.

- Pérez-Rodríguez, F., and Mercanoglu Taban, B. (2019). A State-of-Art Review on Multi-Drug Resistant Pathogens in Foods of Animal Origin: Risk Factors and Mitigation Strategies. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.02091.
- Pérez, F. (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 459–469. doi:10.1016/j.coph.2007.08.003.
- Piedra-Carrasco, N., Fàbrega, A., Calero-Cáceres, W., Cornejo-Sánchez, T., Brown-Jaque, M., Mir-Cros, A., et al. (2017). Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. *PLoS One* 12, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0175246.
- Piper, C., Draper, L. A., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2009). A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 546–551. doi:10.1093/jac/dkp221.
- Poirel, L., Decousser, J., and Nordmann, P. (2003). Insertion Sequence IS Ecp1B Is Involved in Expression and Mobilization of a *bla*CTX-M β -Lactamase Gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2938–2945. doi:10.1128/AAC.47.9.2938.
- Pompilio, A., Crocetta, V., Scocchi, M., Pomponio, S., Di Vincenzo, V., Mardirossian, M., et al. (2012). Potential novel therapeutic strategies in cystic fibrosis: Antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed -helical peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia*. *BMC Microbiol.* 12. doi:10.1186/1471-2180-12-145.
- Porrero, M. C., Harrison, E., Fernández-Garayzábal, J. F., Paterson, G. K., Díez-Guerrier, A., Holmes, M. A., et al. (2014a). Detection of *mecC*-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in river water: A potential role for water in the environmental dissemination. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 705–708. doi:10.1111/1758-2229.12191.
- Porrero, M. C., Valverde, A., Fernández-Llario, P., Díez-Guerrier, A., Mateos, A., Lavín, S., et al. (2014b). *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene in animals and Urban Wastewater, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 899–901. doi:10.3201/eid2005.130426.
- Porse, A., Schønning, K., Munck, C., and Sommer, M. O. A. (2016). Survival and Evolution of a Large Multidrug Resistance Plasmid in New Clinical Bacterial Hosts. *Mol. Biol. Evol.* 33, 2860–2873. doi:10.1093/molbev/msw163.
- PRAN (2020). Informe Anual PRAN. 38. Available at: https://resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_anual_pran_2019_2020_0.pdf?file=1&type=node&id=577&force=0.
- Pratt, R. F. (2016). β -Lactamases: Why and How. *J. Med. Chem.* 59, 8207–8220. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00448.
- Purse, E., Sünderhauf, D., Gaze, W. H., Westra, E. R., and van Houte, S. (2018). CRISPR-Cas antimicrobials: Challenges and future prospects. *PLoS Pathog.* 14, e1006990. doi:10.1371/journal.ppat.1006990.
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S., and Igrejas, G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. *Front. Microbiol.* 5, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2014.00023.
- Raeispour, M., and Ranjbar, R. (2018). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 7.1-9 doi:10.1186/s13756-018-0411-4.

- Rai, M., Kon, K., Ingle, A., Duran, N., Galdiero, S., and Galdiero, M. (2014). Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: The emerging trends and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1951–1961. doi:10.1007/s00253-013-5473-x.
- Razquin-Olazarán, I. (2012). Diseño racional de péptidos derivados de la lactoferrina humana con actividad permeabilizante mejorada y capacidad de producir permeabilidad asociada al efecto postantibiótico (PAEP). Tesis doctoral. Universidad de Navarra. Available at: <https://hdl.handle.net/10171/23499>.
- Rhouma, M., Beaudry, F., and Letellier, A. (2016). Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 119–126. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008.
- Rizk, D. E., and El-Mahdy, A. M. (2017). Emergence of class 1 to 3 integrons among members of Enterobacteriaceae in Egypt. *Microb. Pathog.* 112, 50–56. doi:10.1016/j.micpath.2017.09.023.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavalieri, M., Coenen, S., et al. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes New Infect.* 6, 22–29. doi:10.1016/j.nmni.2015.02.007.
- Rodríguez-Ferri, E. (2020). Zoonosis emergentes epidémicas y pandémicas. Consideraciones de actualidad. *Organ. Col. Vet. Española* 1, 1–37.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L., Canton, R., and Nordmann, P. (2006). Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2544–2546. doi:10.1128/AAC.00609-05.
- Roe, M. T., Vega, E., and Pillai, S. D. (2003). Antimicrobial Resistance Markers of Class 1 and Class 2 Integron- bearing *Escherichia coli* from Irrigation Water and Sediments. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 5–9.
- Rogers, B. A., Sidjabat, H. E., and Paterson, D. L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1–14. doi:10.1093/jac/dkq415.
- Rossi, F., Rizzotti, L., Felis, G. E., and Torriani, S. (2014). Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge and future perspectives. *Food Microbiol.* 42, 232–243. doi:10.1016/j.fm.2014.04.004.
- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., and Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poult. Sci.* 98, 1791–1804. doi:10.3382/ps/pey539.
- Ruiz, J., Simon, K., Horcajada, J. P., Velasco, M., Barranco, M., Roig, G., et al. (2002). Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4445–4449. doi:10.1128/JCM.40.12.4445-4449.2002.
- Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., et al. (2004). Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3996–4001. doi:10.1128/AAC.48.10.3996.
- Saiman, L. (2007). Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: “the motion for.” *Paediatr. Respir.*

- Rev. 8, 249–255. doi:10.1016/j.prrv.2007.04.006.
- Saleh, A. A., and El-Magd, M. A. (2018). Beneficial effects of dietary silver nanoparticles and silver nitrate on broiler nutrition. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 27031–27038. doi:10.1007/s11356-018-2730-7.
- Sánchez-Gómez, S. (2008). Potenciación de antibióticos mediante péptidos catiónicos permeabilizantes: aplicación al desarrollo de terapias frente a la sepsis debida a *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra.
- Sánchez-Gómez, S., Japelj, B., Jerala, R., Moriyón, I., Alonso, M. F., Leiva, J., et al. (2011). Structural features governing the activity of lactoferricin-derived peptides that act in synergy with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 218–228. doi:10.1128/AAC.00904-10
- Sánchez-Gómez, S., Ferrer-Espada, R., Stewart, P. S., Pitts, B., Lohner, K., and Martínez De Tejada, G. (2015). Antimicrobial activity of synthetic cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferricin against *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cultures and biofilms. *BMC Microbiol.* 15, 1–11. doi:10.1186/s12866-015-0473-x.
- Sánchez-Gómez, S., and Martínez-de-Tejada, G. (2017). Antimicrobial Peptides as Anti-biofilm Agents in Medical Implants. *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 590–603. doi:10.2174/1568026616666160713141439.
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J. A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., et al. (2020). ESKAPE Bacteria and Extended-Spectrum- β -Lactamase- Producing *Escherichia coli* Isolated from Wastewater and Process Water from German Poultry Slaughterhouses. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1-18. doi:https://doi.org/10.1128/AEM.02748-19.
- Searle, L. J., Méric, G., Porcelli, I., Sheppard, S. K., and Lucchini, S. (2015). Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of *Escherichia coli*. *PLoS One* 10, 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0117906.
- Seral, C., José Gude, M., and Javier Castillo, F. (2012). Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (Pampc ó cefamicinasas): Origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev. Esp. Quimioter.* 25, 89–99.
- Shahrour, H., Ferrer-Espada, R., Dandache, I., Bárcena-Varela, S., Sánchez-Gómez, S., Chokr, A., et al. (2019). “AMPs as anti-biofilm agents for human therapy and prophylaxis,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Springer New York LLC), 257–279. doi:10.1007/978-981-13-3588-4_14.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., and Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamasas: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 22, 90–101. doi:10.1016/j.sjbs.2014.08.002.
- Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., and Ramasamy, J. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS - J. Med. Soc.* 32, 76–77. doi:10.4103/jms.jms_25_17.
- Sikkema, R., and Koopmans, M. (2016). *One Health* training and research activities in Western Europe. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 6, 33703. doi:10.3402/iee.v6.33703.
- Silver, S. (2003). Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 341–353. doi:10.1016/S0168-6445(03)00047-0.

- Singh, R., Smitha, M. S., and Singh, S. P. (2014). The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 4745–4756. doi:10.1166/jnn.2014.9527.
- Siqueiros-Cendón, T., Arévalo-Gallegos, S., Iglesias-Figueroa, B. F., García-Montoya, I. A., Salazar-Martínez, J., and Rascón-Cruz, Q. (2014). Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 557–566. doi:10.1038/aps.2013.200.
- Solberg, O., Ajiboye, R., and Riley, L. (2006). Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1347–1351. doi:10.1128/JCM.44.4.1347.
- Spanu, T., Fiori, B., D’Inzeo, T., Canu, G., Campoli, S., Giani, T., et al. (2012). Evaluation of the new NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (*blaKPC*). *J. Clin. Microbiol.* 50, 2783–2785. doi:10.1128/JCM.00284-12.
- Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., and Kostrzewa, M. (2012). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* 50, 927–937. doi:10.1128/JCM.05737-11.
- Stedman, A., Maluquer De Motes, C., Lesellier, S., Dalley, D., Chambers, M., and Gutierrez-Merino, J. (2018). Lactic acid Bacteria isolated from European badgers (*Meles meles*) reduce the viability and survival of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine and influence the immune response to BCG in a human macrophage model. *BMC Microbiol.* 18, 1–14. doi:10.1186/s12866-018-1210-z.
- Stedman, A., van Vliet, A. H. M., A. Chambers, M., and Gutierrez-Merino, J. (2020). Gut commensal bacteria show beneficial properties as wildlife probiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1467, 112–132. doi:10.1111/nyas.14302.
- Stevens, D. L., Bisno, A. L., Chambers, H. F., Dellinger, E. P., Goldstein, E. J. C., Gorbach, S. L., et al. (2014). Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 59. doi:10.1093/cid/ciu296.
- Stokes, H. W., and Hall, R. M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3, 1669–1683. doi:10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x.
- Stryjewski, M. E., and Corey, G. R. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolving pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 58, 10–19. doi:10.1093/cid/cit613.
- Stuart, J. C., Voets, G., Scharringa, J., Fluit, A. C., and Leverstein-Van Hall, M. A. (2012). Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a commercial DNA microarray. *J. Med. Microbiol.* 61, 809–812. doi:10.1099/jmm.0.041673-0.
- Suárez, C., and Gudiol, F. (2009). Antibioticos betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27, 116–129. Available at: <https://medes.com/publication/49183>.
- Subashini, J., Gopiesh Khanna, V., and Kannabiran, K. (2014). Anti-ESBL activity of silver nanoparticles biosynthesized using soil *Streptomyces* species. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 999–1006. doi:10.1007/s00449-013-1070-8.
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., and Haq, Q. M. R. (2018).

- Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Front. Microbiol.* 9, 1-18. doi:10.3389/fmicb.2018.02066.
- Sun, Y., Zeng, Z., Chen, S., Ma, J., He, L., Liu, Y., et al. (2010). High prevalence of *bla*CTX-M extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1475–1481. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03127.x.
- Tamang, M. D., Nam, H. M., Gurung, M., Jang, G. C., Kim, S. R., Jung, S. C., et al. (2013). Molecular characterization of CTX-M β -lactamase and associated addiction systems in *Escherichia coli* circulating among cattle, farm workers, and the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3898–3905. doi:10.1128/AEM.00522-13.
- Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., and Hsu, L. Y. (2014). Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 78, 3–13. doi:10.1016/j.addr.2014.08.003.
- Tansawai, U., Sanguansermisri, D., Na-udom, A., Walsh, T. R., and Niumsup, P. R. (2018). Occurrence of extended spectrum β -lactamase and AmpC genes among multidrug-resistant *Escherichia coli* and emergence of ST131 from poultry meat in Thailand. *Food Control* 84, 159–164. doi:10.1016/j.foodcont.2017.07.028.
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M., and Nakonieczna, J. (2013). Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *Biomed Res. Int.* 2013, 1-13. doi:10.1155/2013/150653.
- Tartof, S. Y., Solberg, O. D., Manges, A. R., and Riley, L. W. (2005). Analysis of a Uropathogenic *Escherichia coli* Clonal Group by Multilocus Sequence Typing. *Society* 43, 5860–5864. doi:10.1128/JCM.43.12.5860.
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., and Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 472–477. doi:10.1016/j.mib.2008.09.006.
- Thean, Y. T., Ng, L. S. Y., He, J., Tse, H. K., and Li, Y. H. (2009). Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 146–149. doi:10.1128/AAC.00862-08.
- Thomson, K. S. (2010). Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1019–1025. doi:10.1128/JCM.00219-10.
- Tiba, M. R., Yano, T., and Leite, D. da S. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 50, 255–260. doi:10.1590/s0036-46652008000500001.
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., and Walsh, T. R. (2006a). Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1–6. doi:10.1093/jac/dkl204.
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., and Walsh, T. R. (2006b). ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 296–316. doi:10.1128/MMBR.00048-05.
- Torres, C. (2012). La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. *Col. Of. Farm. Zaragoza*, 1–48.
- UE (2003). REGLAMENTO (CE) N° 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL

- CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. *D. Of. la Unión Eur.* 4, 24–28.
- UE (2006). Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. *Regulation*, 1.
- UE (2009). Reglamento (Ce) N. 1223/2009 Del Parlamento Europeo y Del Consejo. *D. Of. la Unión Eur.* 2009, 12.
- Vagrals, M. (2009). Siderophore production by uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 52, 126–127. doi:10.4103/0377-4929.44988.
- Vaidya, V. (2011). Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended-spectrum β Lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J. Lab. Physicians* 3, 37–42. doi:10.4103/0974-2727.78563.
- Vangchhia, B., Abraham, S., Bell, J. M., Collignon, P., Gibson, J. S., Ingram, P. R., et al. (2016). Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of phylogroup F *Escherichia coli* in Australia. *Microbiol. (United Kingdom)* 162, 1904–1912. doi:10.1099/mic.0.000367.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., and Manaia, C. M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: Searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 761–778. doi:10.1111/1574-6976.12062.
- Vindgaard, N., and Benros, M. E. (2020). COVID-19 pandemic and mental health consequences: Systematic review of the current evidence. *Brain. Behav. Immun.* 89, 531–542. doi:10.1016/j.bbi.2020.05.048.
- Vinué, L., Sáenz, Y., Somalo, S., Escudero, E., Moreno, M. Á., Ruiz-Larrea, F., et al. (2008). Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 934–937. doi:10.1093/jac/dkn331.
- Vitas, A. I., Naik, D., Pérez-Etayo, L., and González, D. (2018). Increased exposure to extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug-resistant Enterobacteriaceae through the consumption of chicken and sushi products. *Int. J. Food Microbiol.* 269, 80–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.026.
- Von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., et al. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* 7, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.00173.
- Vranciuanu, C. O., Gheorghe, I., Dobre, E. G., Barbu, I. C., Cristian, R. E., Popa, M., et al. (2020). Emerging strategies to combat β -lactamase producing ESKAPE pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–46. doi:10.3390/ijms21228527.
- Waksman, G., and Hultgren, S. J. (2009). Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 765–774. doi:10.1038/nrmicro2220.
- Walk, S. T., Alm, E. W., Gordon, D. M., Ram, J. L., Toranzos, G. A., Tiedje, J. M., et al. (2009). Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6534–6544. doi:10.1128/AEM.01262-09.
- Wang, J., Stephan, R., Zurfluh, K., Hächler, H., and Fanning, S. (2015). Characterization of the

- genetic environment of *bla*ESBL genes, integrons and toxin-antitoxin systems identified on large transferrable plasmids in multi-drug resistant *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 6, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2014.00716.
- Wenjuan Yin, Hui Li, Y. S., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Timothy R. Walsh, J. S., et al. (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli* Wenjuan. *MBio*, 4–9.
- WHO (2014). Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. *World Heal. Organ.* 61, 383–394. doi:10.1007/s13312-014-0374-3.
- WHO (2015). Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos. *WHO Libr. Cat.*, 30.
- WHO (2016). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 5th Revision 2016 Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 5th rev Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC.
- WHO (2017a). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Who*. Available at: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- WHO (2017b). A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). *Eur. Comm.*, 24. Available at: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_2017_action-plan.pdf
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., and Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 965–974. doi:10.1007/s00253-011-3783-4.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., et al. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.
- Woodford, N., Fagan, E. J., and Ellington, M. J. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases [4]. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 154–155. doi:10.1093/jac/dki412.
- Woodford, N., Carattoli, A., Karisik, E., Underwood, A., Ellington, M. J., and Livermore, D. M. (2009). Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4472–4482. doi:10.1128/AAC.00688-09.
- Woodford, N., Turton, J. F., and Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 736–755. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x.
- Woolhouse, M. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *J. High Energy Phys.* 6, 1575–1589. doi:10.1088/1126-6708/2002/10/069.
- Wullt, B., Bergsten, G., Connell, H., Röllano, P., Gebretsadik, N., Hull, R., et al. (2000). P fimbriae enhance the early establishment of *Escherichia coli* in the human urinary tract.

- Mol. Microbiol.* 38, 456–464. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02165.x.
- Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhel, R., Butaye, P., and Goossens, H. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin- resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June. *Eurosurveillance* 6–11. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>
- Xu, Y., Guo, C., Luo, Y., Lv, J., Zhang, Y., Lin, H., et al. (2016). Occurrence and distribution of antibiotics, antibiotic resistance genes in the urban rivers in Beijing, China. *Environ. Pollut.* 213, 833–840. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.054.
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., and Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12, 85–90. doi:10.1016/0928-8244(95)00053-A.
- Yang, Y., Ashworth, A. J., Willett, C., Cook, K., Upadhyay, A., Owens, P. R., et al. (2019). Review of Antibiotic Resistance, Ecology, Dissemination, and Mitigation in U.S. Broiler Poultry Systems. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2019.02639.
- Yuan, Y. G., Peng, Q. L., and Gurunathan, S. (2017). Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 569–591. doi:10.3390/ijms18030569.
- Zarei, M., Jamnejad, A., and Khajehali, E. (2014). Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur J. Microbiol.* 7, 1–4. doi:10.5812/jjm.8720.
- Zarfel, G., Lipp, M., Gürtl, E., Folli, B., Baumert, R., and Kittinger, C. (2017). Troubled water under the bridge: Screening of River Mur water reveals dominance of CTX-M harboring *Escherichia coli* and for the first time an environmental VIM-1 producer in Austria. *Sci. Total Environ.* 593–594, 399–405. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.138.
- Zhang, B., and Guo, Y. (2007). Beneficial effects of tetrabasic zinc chloride for weanling piglets and the bioavailability of zinc in tetrabasic form relative to ZnO. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 75–85. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.006.
- Zhang, Q., Lv, L., Huang, X., Huang, Y., Zhuang, Z., Lu, J., et al. (2019). Rapid increase in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in retail meat driven by the spread of the *bla*NDM-5-carrying IncX3 plasmid in China from 2016 to 2018. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, 1–6. doi:10.1128/AAC.00573-19.
- Zhao, W. H., and Hu, Z. Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 79–101. doi:10.3109/1040841X.2012.691460.
- Zhu, S., Fage, C. D., Hegemann, J. D., Mielcarek, A., Yan, D., Linne, U., et al. (2016). The B1 Protein Guides the Biosynthesis of a Lasso Peptide. *Sci. Rep.* 6, 1–12. doi:10.1038/srep35604.
- Zogg, A. L., Zurfluh, K., Schmitt, S., Nüesch-Inderbilen, M., and Stephan, R. (2018). Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats and dogs in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 216, 79–84. doi:10.1016/j.vetmic.2018.02.011.
- Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch-Inderbilen, M., and Stephan, R. (2013). Characteristics of

extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3021–3026. doi:10.1128/AEM.00054-13.

Anexo I



Artículos publicados



Article

Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Different Aquatic Environments in the North of Spain and South of France

Lara Pérez-Etayo ^{1,*} , David González ^{1,2}, José Leiva ³ and Ana Isabel Vitas ^{1,2}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain; dgonzalez@unav.es (D.G.); avitas@unav.es (A.I.V.)

² IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, 31008 Pamplona, Spain

³ Microbiology Service, Clínica Universidad de Navarra, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain; jleiva@unav.es

* Correspondence: lperez.13@alumni.unav.es; Tel.: +34-948-425-600

Received: 6 August 2020; Accepted: 15 September 2020; Published: 16 September 2020



Abstract: Due to the global progress of antimicrobial resistance, the World Health Organization (WHO) published the list of the antibiotic-resistant “priority pathogens” in order to promote research and development of new antibiotics to the families of bacteria that cause severe and often deadly infections. In the framework of the One Health approach, the surveillance of these pathogens in different environments should be implemented in order to analyze their spread and the potential risk of transmission of antibiotic resistances by food and water. Therefore, the objective of this work was to determine the presence of high and critical priority pathogens included in the aforementioned list in different aquatic environments in the POCTEFA area (North Spain–South France). In addition to these pathogens, detection of colistin-resistant Enterobacteriaceae was included due its relevance as being the antibiotic of choice to treat infections caused by multidrug resistant bacteria (MDR). From the total of 80 analyzed samples, 100% of the wastewater treatment plants (WWTPs) and collectors (from hospitals and slaughterhouses) and 96.4% of the rivers, carried antibiotic resistant bacteria (ARB) against the tested antibiotics. Fifty-five (17.7%) of the isolates were identified as target microorganisms (high and critical priority pathogens of WHO list) and 58.2% ($n = 32$) of them came from WWTPs and collectors. Phenotypic and genotypic characterization showed that 96.4% were MDR and resistance to penicillins/cephalosporins was the most widespread. The presence of *bla* genes, KPC-type carbapenemases, *mcr-1* and *vanB* genes has been confirmed. In summary, the presence of clinically relevant MDR bacteria in the studied aquatic environments demonstrates the need to improve surveillance and treatments of wastewaters from slaughterhouses, hospitals and WWTPs, in order to minimize the dispersion of resistance through the effluents of these areas.

Keywords: WWTPs; collectors; rivers; antibiotic resistance bacteria; antibiotic resistance gene; ESBL

1. Introduction

One of the highest public health challenges worldwide is the increase in the number and types of antimicrobial resistances (AMR) [1]. The use and misuse of antimicrobials in human medicine is one of the main causes of this increasing problem, but inappropriate practices in intensive livestock farms have also contributed to the alarming increase in antibiotic resistant bacteria (ARB) [2,3]. Antibiotics used in animal production with different purposes (therapeutically and prophylactically) are finally disseminated through the environment. It has been estimated that about 75% of the administered antibiotics is not absorbed by animals and is excreted via the feces or urine [4]. In this sense, García-Galán et al., 2011 [5] reported the presence of emerging pollutants in the Ebro basin



Increased exposure to extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* through the consumption of chicken and sushi products

Ana Isabel Vitas*, Dixita Naik, Lara Pérez-Etayo, David González

Department of Microbiology and Parasitology, University of Navarra, C/Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain
 IDISNA, Navarra Health Research Institute, Pamplona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

ESBL
 Chicken
 Sushi
 Multidrug resistances
 CTX-M
 SHV-12

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the occurrence and patterns of resistance of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food products purchased in Navarra, northern Spain. A total of 174 samples of fish and chicken were analyzed from September 2015 to September 2016, including raw and ready-to-eat products: trout ($n = 25$), salmon ($n = 28$), panga ($n = 13$), chicken nuggets and chicken scalopes ($n = 32$), sushi ($n = 31$) and sliced cooked poultry ($n = 45$). Cefpodoxime-resistant strains were isolated on ChromID ESBL agar and further phenotypic (antimicrobial study on MicroScan© NM37 panel) and genotypic characterization (multiplex PCR, sequencing and multi-locus sequence typing, MLST) was performed to confirm and characterize ESBL producers. Raw chicken and sushi have been determined as the most risky products regarding transmission of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (occurrence 53.1% and 19.4%, respectively), while sliced cooked poultry products appear to be a safe product in this aspect. With regard to raw fish, prevalence in salmon was lower (3.6%) than in trout and panga (16.0%). Ninety-eight per cent of ESBL isolates ($n = 50$) show multidrug-resistant profiles, highlighting the high resistances against quinolones and tetracyclines observed in chicken isolates, as well as against ertapenem and chloramphenicol in sushi strains. Predominant β -lactamase type was SHV-12 (50.1%), followed by TEM-type (24.5%) and CTX-M (20.8%). In addition, CTX-M type was only detected in chicken products. The phylogenetic study showed the prevalence of groups A (35%), F (25%) and B1 (15%), usually related to nonvirulent strains. MLST *E. coli* isolates ($n = 20$) were grouped into 5 clonal complexes (CC) and 15 sequence types (ST), showing high clonal diversity. ST117 was the prevalent sequence type, while the human pathogen ST131 was not detected in this study. The high prevalence of ESBL-producing multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* detected in products of widespread consumption such as chicken and sushi, increases the concern regarding human exposure to superbugs and encourages the need to improve surveillance of this public health issue.

1. Introduction

During the last decade extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) have become a major public health concern because of the possible transmission of these bacteria to humans (Wang et al., 2006). In fact, the number of infections caused by these bacteria has increased throughout the world (Al-mayahie et al., 2016; Ouedraogo et al., 2016; WHO, 2014). Furthermore, ESBL-E usually exhibit co-resistance to multiple classes of antibiotics, increasing the risk of clinical treatment failure.

In addition to clinical environments and healthy carriers (Villar et al., 2013), ESBL-E producers have been isolated from a wide range of

sources, such as foods (Denis et al., 2015; Ojer-Usoz et al., 2013; Petternel et al., 2014; Rasmussen et al., 2015), water environments (Hu et al., 2013; Korzeniewska et al., 2013; Ojer-Usoz et al., 2014) and wild and domestic animals (Alcalá et al., 2016; Bogaerts et al., 2015). Among other reasons, the wide dissemination of β -lactam resistances in different environments is related to the association of ESBL- and AmpC encoding genes with mobile genetic elements (Schultsz and Geerlings, 2012), which facilitates the spread of resistances within intense bacterial communities, such as intestinal microbiota of livestock or wastewater treatment plants.

Poultry meat is considered an important reservoir of antibiotic resistances and high prevalence of ESBL-E (especially *E. coli*) has been

* Corresponding author.

E-mail address: avitas@unav.es (A.I. Vitas).



Article

Prevalence of Integrons and Insertion Sequences in ESBL-Producing *E. coli* Isolated from Different Sources in Navarra, Spain

Lara Pérez-Etayo ^{1,*} , Melibea Berzosa ¹, David González ^{1,2} and Ana Isabel Vitas ^{1,2}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain; mberzosa.1@alumni.unav.es (M.B.); dgonzalez@unav.es (D.G.); avitas@unav.es (A.I.V.)

² IDISNA, Navarra Health Research Institute, 31008 Pamplona, Spain

* Correspondence: lperez.13@alumni.unav.es; Tel.: +34-948-425-600

Received: 14 September 2018; Accepted: 18 October 2018; Published: 20 October 2018



Abstract: Mobile genetic elements play an important role in the dissemination of antibiotic resistant bacteria among human and environmental sources. Therefore, the aim of this study was to determine the occurrence and patterns of integrons and insertion sequences of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from different sources in Navarra, northern Spain. A total of 150 isolates coming from food products, farms and feeds, aquatic environments, and humans (healthy people and hospital inpatients), were analyzed. PCRs were applied for the study of class 1, 2, and 3 integrons (*intI1*, *intI2*, and *intI3*), as well as for the determination of insertion sequences (IS26, *ISEcp1*, *ISCR1*, and IS903). Results show the wide presence and dissemination of *intI1* (92%), while *intI3* was not detected. It is remarkable, the prevalence of *intI2* among food isolates, as well as the co-existence of class 1 and class 2 (8% of isolates). The majority of isolates have two or three IS elements, with the most common being IS26 (99.4%). The genetic pattern IS26–*ISEcp1* (related with the pathogen clone ST131) was present in the 22% of isolates (including human isolates). In addition, the combination *ISEcp1*–IS26–IS903–*ISCR1* was detected in 11 isolates being, to our knowledge, the first study that describes this genetic complex. Due to the wide variability observed, no relationship was determined among these mobile genetic elements and β -lactam resistance. More investigations regarding the genetic composition of these elements are needed to understand the role of multiple types of integrons and insertion sequences on the dissemination of antimicrobial resistance genes among different environments.

Keywords: ESBL-producing *E. coli*; β -lactamase genes; antimicrobial resistance; integrons; insertion sequences

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) has become a public health problem, reaching alarming levels in many parts of the world [1,2]. In recent years, resistances in the Enterobacteriaceae family have increased significantly because of the extensive use of antibiotics in human treatment, veterinary, and agriculture, leading to the selection and global spread of resistant clones [3,4]. In particular, the dissemination of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) have increased dramatically in the recent years, becoming a serious global threat [5,6].

Several genetic mechanisms have been involved in the acquisition and dispersion of antimicrobial resistances. The commonly called “mobilome” [7,8] is composed of a variety of mobile genetic elements (MGEs), including plasmids, transposons (Tn), insertion sequences (IS), integrons (*intI*), and introns. Conjugation, transformation, and transduction are the main mechanisms for the horizontal transfer of MGEs [9,10].



Article

The Aquatic Ecosystem, a Good Environment for the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Factors Among Extended Spectrum β -lactamases Producing *E. coli*

Lara Pérez-Etayo ^{1,*} , David González ^{1,2} and Ana Isabel Vitas ^{1,2}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain; dgonzalez@unav.es (D.G.); avitas@unav.es (A.I.V.)

² Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IDISNA), 31008 Pamplona, Spain

* Correspondence: lperez.13@alumni.unav.es; Tel.: +34-948-425-600

Received: 26 February 2020; Accepted: 12 April 2020; Published: 15 April 2020



Abstract: One of the main public health problems nowadays is the increase of antimicrobial resistance, both in the hospital environment and outside it (animal environment, food and aquatic ecosystems, among others). It is necessary to investigate the virulence-associated factors and the ability of horizontal gene transfer among bacteria for a better understanding of the pathogenicity and the mechanisms of dissemination of resistant bacteria. Therefore, the objective of this work was to detect several virulence factors genes (*fimA*, *papC*, *papG* III, *cnf1*, *hlyA* and *aer*) and to determine the conjugative capacity in a wide collection of extended-spectrum β -lactamases-producing *E. coli* isolated from different sources (human, food, farms, rivers, and wastewater treatment plants). Regarding virulence genes, *fimA*, *papC*, and *aer* were distributed throughout all the studied environments, *papG* III was mostly related to clinical strains and wastewater is a route of dissemination for *cnf1* and *hlyA*. Strains isolated from aquatic environments showed an average conjugation frequencies of $1.15 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$, being significantly higher than those observed in strains isolated from farms and food ($p < 0.05$), with frequencies of $1.53 \times 10^{-4} \pm 2.85 \times 10^{-4}$ and $9.61 \times 10^{-4} \pm 1.96 \times 10^{-3}$, respectively. The reported data suggest the importance that the aquatic environment (especially WWTPs) acquires for the exchange of genes and the dispersion of resistance. Therefore, specific surveillance programs of AMR indicators in wastewaters from animal or human origin are needed, in order to apply sanitation measures to reduce the burden of resistant bacteria arriving to risky environments as WWTPs.

Keywords: virulence factor; antibiotic resistance; ESBL; wastewater; horizontal gene transfer

1. Introduction

E. coli is one of the main causative agents of gastrointestinal and extra intestinal infections. This ubiquitous organism is a major element of the normal commensal microbiota in the human and animal intestinal tract and it has been found in soil, food, water, and vegetation [1]. The ability of *E. coli* to cause a variety of infectious diseases, such as sepsis, pneumonia, or urinary tract infections, is associated with the expression of specific virulence factors (VFs). In addition, the multidrug resistance profile of *E. coli* strains increases the risk of antimicrobial treatment failure in both humans and animals [2].

Resistance to antibiotics can occur by different processes, like the acquisitions of antimicrobial resistance genes (ARGs) via horizontal gene transfer (HGT). Several genetic mechanisms have been involved in the spread of ARGs, but conjugation is thought to have the greatest influence [3]. Furthermore, it has been reported that *E. coli* obtains antimicrobial resistance faster than other microorganisms [4]. It is especially relevant regarding the increase of β -lactam resistance in *E. coli* due

Anexo II



Material suplementario

Table S1.1. Characteristics of sampling points in rivers (north of Spain and south of France). Data supplied by the Laboratory of Water and Environmental Health from University of Zaragoza.

Code	River	Location (country)	Cattle Exploitations						
			Porcine	Poultry	Rabbits	Ovine	Bovine	Equine	Caprine
1_ASE	Segre	Lleida (Spain)	x	x	-	-	-	-	-
2_ASE	Noguera Ribagorzana	Lleida (Spain)	x	x	x	-	-	-	-
3_ASE	Clamor Amarga	Huesca (Spain)	x	x	x	-	x	-	-
4_ASE	Cinca	Huesca (Spain)	x	x	x	-	-	-	-
5_ASE	Alcanadre	Huesca (Spain)	x	x	-	-	-	-	-
6_ASE	Flumen	Huesca (Spain)	x	x	x	-	x	-	-
7_ASE	Gállego	Zaragoza (Spain)	x	x	-	-	x	-	-
8_ASE	Arba de Riquel	Zaragoza (Spain)	x	-	-	x	-	-	-
9_ASE	Aragon subordan	Huesca (Spain)	-	-	-	x	-	x	x
10_ASE	Aragón	Navarra (Spain)	x	x	-	-	-	x	-
11_ASE	Irantzu	Navarra (Spain)	x	x	-	-	-	x	-
12_ASE	Arakil	Navarra (Spain)	x	x	-	x	-	x	x
13_ASE	Queies	Zaragoza (Spain)	x	x	-	-	-	x	-
14_ASE	Alhama	La Rioja (Spain)	x	x	-	-	-	x	-
15_ASE	Ega	Navarra (Spain)	x	x	-	-	-	x	-
16_ASE	Ega	Navarra (Spain)	x	x	-	-	-	x	-
17_ASE	Arga	Navarra (Spain)	x	x	-	x	x	x	-
18_ASE	Arga	Navarra (Spain)	x	x	-	x	x	x	-
19_ASE	Ebro	Navarra (Spain)	x	x	x	-	-	x	-
20_ASE	Ebro	Navarra (Spain)	x	x	x	-	-	x	-
21_ASC	Bidasoa	Navarra (Spain)	x	-	-	x	-	-	x
22_ASC	Bidasoa	Navarra (Spain)	x	-	-	x	-	-	x
23_ASA	L'Adour	Pyrénées-atlantiques (France)	x	x	-	x	-	-	x
24_ASA	Le Gabas	Pyrénées-atlantiques (France)	x	x	-	-	-	-	-
25_ASA	La Garonne	Haute-Garonne (France)	-	x	x	-	-	-	-
26_ASA	La Save	Haute-Garonne (France)	x	x	x	-	-	-	-
27_ASA	L'Echez	Haute-Pyrénées (France)	x	x	x	-	-	-	-
28_ASA	La Baïse	Haute-Pyrénées (France)	x	x	x	-	-	-	-

ASE: Surface water of the Ebro basin; ASC: Surface water of the Cantabrian basin; ASA / G: Surface water of the Adour-Garonne basin.

Table S1.2. Characteristics of sampling points for sewage water in the Navarra Region. Data supplied by the Laboratory of Water and Environmental Health from University of Zaragoza.

Code	Sampling point	Location	Inhabitants	River receiver	Type of waste
29_ARD1e	WWTP (influent)	Estella	90.000	Ega	Urban
30_ARD1s	WWTP (effluent)	Estella		Ega	Urban
31_ARD2e	WWTP (influent)	Pamplona	550.000	Arga	Urban
32_ARD2s	WWTP (effluent)	Pamplona		Arga	Urban
33_ARD3e	WWTP (influent)	Tudela	82.500	Ebro	Urban
34_ARD3s	WWTP (effluent)	Tudela		Ebro	Urban
35_ARD4e	WWTP (influent)	Bera	4.900	Bidasoa	Urban
36_ARD4s	WWTP (effluent)	Bera		Bidasoa	Urban
37_ARH	Hospital collector	Tudela	-	Ebro	Hospital
38_ARM	Slaughterhouse collector	Tudela	-	Ebro	Slaughterhouse
39_ARM	Slaughterhouse collector	Bera	-	Bidasoa	Slaughterhouse (ducks)
40_ARM	Slaughterhouse collector	Murchante	-	Ebro	Slaughterhouse (rabbits)

ARDe: Discharge of wastewater entering the treatment plant; ARDs: Discharge of wastewater leaving the treatment plant; ARH: Discharge of hospital wastewater; ARM: Discharge of slaughterhouse wastewater.

Table S1.3. Zone diameter breakpoints for the different antibiotics tested.

Antibiotic	Zone diameter breakpoints (mm)			Microorganism	Guideline
	S	I	R		
Cefotaxime	≥ 26	23-25	≤ 22	Enterobacteriaceae	CLSI
Ceftazidime	≥ 21	18-20	≤ 17		
Ceftriaxone	≥ 23	20-22	≤ 19		
Aztreonam	≥ 21	18-20	≤ 17		
Amox-clavulanate	≥ 18	14-17	≤ 13		
Ertapenem	≥ 22	19-21	≤ 18		
Imipenem	≥ 23	20-22	≤ 19		
Meropenem	≥ 23	20-22	≤ 19		
Ertapenem	ND	ND	ND		
Imipenem	≥ 19	19-18	≤ 15		
Meropenem	≥ 19	19-18	≤ 15		
Ertapenem	ND	ND	ND	<i>A. baumannii</i>	CLSI
Imipenem	≥ 22	19-21	≤ 18		
Meropenem	≥ 18	15-17	≤ 14		
Cefoxitin	≥ 22	-	≤ 21	<i>S. aureus</i>	CLSI
Antibiotic	MIC Breakpoints (µg/mL)			Microorganism	Guideline
	S	I	R		
Colistin	≤ 2	-	≥ 2	Enterobacteriaceae	EUCAST
Vancomycin	≤ 4	8-16	≥ 32	<i>E. faecium</i>	CLSI
Teicoplanin	≤ 8	16	≥ 32		

Table S3.2. Phenotypic and genotypic characteristics of isolates from hospital inpatients (*n*=36)

N°	β-lactamase genes	Phylogroup	MLST		Integrans		Insertion Sequence			
			Sequence type (ST)	Clonal complex (CC)	intI1	intI2	ISEcp1	IS26	IS903	ISCR1
1	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{OXA-1}	B2	ST838	ST131	+	-	-	+	+	-
2	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-42}	A	ST453	ST86	+	+	+	+	+	-
3	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	D	ST563	ST398	+	-	+	+	+	-
4	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-42}	B2	ST3329	ST131	+	-	+	+	+	-
5	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST98	ST10	+	+	+	+	+	-
6	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	B2	ST3329	ST131	+	-	+	+	+	-
7	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	D	ST648	ST648	+	-	+	+	+	+
8	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	B2	ST3213	ST131	+	-	-	+	+	-
9	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-42}	D	ST867	ND	+	-	+	+	+	+
10	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	B1	ST448	ST448	+	-	+	+	+	-
11	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	B2	ST3213	ST131	+	-	-	+	+	-
12	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	B2	ST2704	ST131	+	-	-	+	+	-
13	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}	D	ST405	ST405	+	-	-	+	+	-
14	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	B2	ST3878	ST131	+	-	-	+	+	-
15	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}	D	ST405	ST405	+	-	-	+	+	-
16	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12}	A	ST617	ST10	+	-	+	+	+	+
17	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	D	ST648	ST648	+	-	-	+	-	-
18	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	D	ST72	ST405	+	-	-	+	+	-
19	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{OXA-1}	B2	ST73	ST73	+	-	+	+	+	-
20	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	B2	ST3878	ST131	+	-	+	+	-	-
21	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST617	ST10	+	-	+	+	+	-
22	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	D	ST69	ST69	+	-	+	+	+	+
23	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	D	ST405	ST405	+	-	+	+	+	+
24	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST410	ST23	+	-	+	+	+	+
25	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	D	ST648	ST648	+	-	+	+	+	-
26	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	B1	ST94	ST448	+	-	-	+	+	-
27	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	D	ST405	ST405	-	-	+	+	+	-
28	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-42}	B2	ST95	ST95	+	-	+	+	+	-
29	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	D	ST393	ST31	+	-	+	+	+	+
30	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	B2	ST838	ST131	-	-	+	+	+	-
31	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-14}	D	ST685	ND	+	-	+	+	+	+
32	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	D	ST4849	ND	+	-	+	+	+	+
33	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-42} , <i>bla</i> _{OXA-1}	B2	ST4354	ST131	+	-	+	+	+	-
34	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	B2	ST3213	ST131	-	-	+	+	-	-
35	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12}	A	ST410	ST23	+	-	+	+	+	-
36	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST617	ST10	+	-	+	+	+	-

ND: Not detected

Table S3.3. Phenotypic and genotypic characteristics of aquatic isolates included in the study ($n=33$)

N°	Source ¹	β-lactamase genes	Phylogroup	MLST		Integrans			Insertion Sequence		
				Sequence type (ST)	Clonal complex (CC)	int11	int12	ISEcp1	IS26	IS903	ISCR1
1	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	B1	ST616	ST155	+	-	+	+	-	-
2	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	A	ST617	ST10	+	-	+	+	+	-
3	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	B2	ST3264	ND ²	+	-	+	+	+	-
4	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B1	ST906	ND	+	-	+	+	+	-
5	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA}	B1	ST4764	ND	+	-	+	+	+	-
6	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	D	ST57	ST350	+	-	+	+	-	-
7	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	D	ST950	ND	+	-	+	+	-	-
8	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	A	ST615	ST46	+	-	+	+	+	-
9	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	A	ST93	ST168	+	-	+	+	+	-
10	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	D	ST69	ST69	+	-	+	+	-	-
11	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST167	ST10	+	-	+	+	-	-
12	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B1	ST162	ST469	+	-	+	+	+	-
13	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	A	ST615	ST46	-	-	+	+	+	-
14	WWTP	<i>bla</i> _{TEM-42} , <i>bla</i> _{SHV-12}	A	ST611	ST156	+	-	+	+	+	-
15	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	B1	ST446	ST446	+	-	+	+	+	-
16	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	D	ST686	ND	+	-	+	+	+	-
17	R	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	D	ST906	ND	+	-	+	+	-	-
18	R	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	D	ST3843	ND	+	-	+	+	+	-
19	R	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	D	ST949	ND	+	-	+	+	-	-
20	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	D	ST398	ST398	+	-	+	+	+	-
21	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	D	ST4764	ND	-	-	+	-	-	-
22	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	D	ST469	ST469	+	-	+	+	+	-
23	WWTP	<i>bla</i> _{CTX-M-55}	A	ST3065	ND	+	-	+	+	+	-
24	R	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	B1	ST1285	ND	+	-	+	+	+	-
25	R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	D	ST315	ST38	+	-	+	+	+	-
26	R	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-42}	A	ST98	ST10	+	-	+	+	+	-
27	R	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	B1	ST4212	ND	+	-	-	+	+	-
28	R	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST3530	ND	+	-	+	+	-	-
29	R	<i>bla</i> _{SHV-12}	B1	ST1196	ND	-	+	-	+	+	-
30	R	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST4972	ND	+	-	+	+	+	+
31	R	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	D	ST915	ND	+	-	+	+	+	-
32	R	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	A	ST615	ST46	+	-	+	+	+	-
33	R	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	A	ST615	ST46	+	-	+	+	-	-

¹ R: river; WWTP: wastewater treatment plant ² ND: Not detected

Table S3.4. Phenotypic and genotypic characteristics of isolates from food (*n*=48).

N°	Source ¹	β-lactamase genes	Phylogroup	MLST		Integrans			Insertion Sequence		
				Sequence type (ST)	Clonal complex (CC)	int1	int2	ISEcp1	IS26	IS903	ISCR1
1	C	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	D	ST648	ST648	+	+	+	+	+	-
2	P	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	A	ST615	ST46	-	-	-	+	+	-
3	C	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST615	ST46	+	-	+	+	+	-
4	C	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B1	ST155	ST155	+	-	+	+	+	-
5	C	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B2	ST604	ST101	+	-	+	+	+	-
6	P	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B1	ST179	ST155	+	-	+	+	-	-
7	P	<i>bla</i> _{TEM-42}	B1	ST776	ND	-	-	-	+	+	-
8	C	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12}	D	ST880	ND	+	-	-	+	-	-
9	B	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-42}	B2	ST883	ND	+	-	+	+	-	-
10	B	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	B1	ST776	ND	+	+	+	+	-	-
11	B	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	D	ST880	ND	+	-	+	+	+	-
12	B	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	D	ST57	ST350	+	+	+	+	-	+
13	C	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	D	ST349	ST349	+	-	+	+	-	+
14	B	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	B1	ST448	ST448	+	-	+	+	+	-
15	B	<i>bla</i> _{TEM-55}	B1	ST179	ST155	+	-	-	+	+	-
16	B	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	A	ST373	ST168	+	-	+	+	-	-
17	P	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST44	ST10	+	-	-	+	+	-
18	C	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	B2	ST619	ST101	+	+	+	+	-	-
19	P	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	D	ST955	ND	+	-	-	+	-	+
20	P	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-42}	D	ST648	ST648	+	-	+	+	-	+
21	P	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	A	ST453	ST86	-	-	+	+	+	-
22	C	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-42}	A	ST43	ST10	+	-	+	+	+	+
23	C	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-42}	B1	ST179	ST155	+	-	-	+	-	+
24	C	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	A	ST4402	ND	+	-	+	+	+	-
25	C	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	A	ST98	ST10	+	-	+	+	-	-
26	B	<i>bla</i> _{CTX-M-8} , <i>bla</i> _{TEM-1}	B1	ST949	ND	+	-	-	+	-	-
27	C	<i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{TEM-42}	D	ST844	ND	+	-	-	+	-	-
28	C	<i>bla</i> _{SHV-12}	A	ST6648	ND	+	-	-	+	-	-
29	C	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F	ST117	ND	+	-	+	+	-	-
30	C	<i>bla</i> _{TEML-171} , <i>bla</i> _{SHV-12}	B1	ST101	ST101	+	-	-	+	-	-
31	C	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	C	ST23	ST23	+	-	+	+	+	-
32	C	<i>bla</i> _{SHV-12}	F	ST2085	ND	+	-	-	+	-	-
33	C	<i>bla</i> _{TEML-278} , <i>bla</i> _{SHV-12}	ND	ST2599	ND	+	-	-	+	+	-
34	C	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	A	ST373	ST168	+	-	+	+	+	-
35	C	<i>bla</i> _{TEML-171} , <i>bla</i> _{SHV-12}	ND	ST2062	ND	+	+	-	+	+	-
36	C	<i>bla</i> _{SHV-12}	F	ST354	ST354	+	+	-	+	+	-
37	C	<i>bla</i> _{SHV-12}	Clade I or II	ST23	ST 23	+	-	-	+	-	-
38	C	<i>bla</i> _{SHV-12}	A	ND	ND	+	-	-	+	-	-
39	C	<i>bla</i> _{SHV-12}	A	ST665	ND	+	+	-	+	-	-
40	C	<i>bla</i> _{TEML-171} , <i>bla</i> _{SHV-12}	F	ST354	ST35	+	-	-	+	+	-
41	C	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{SHV-12}	A	ST93	ST168	+	+	+	+	+	-
42	C	<i>bla</i> _{TEML-171} , <i>bla</i> _{SHV-12}	B1	ST937	ND	+	-	-	+	+	-
43	C	<i>bla</i> _{TEML-171} , <i>bla</i> _{SHV-12}	A	ST10	ST10	+	+	+	+	+	-
44	C	<i>bla</i> _{SHV-12}	F	ST117	ND	+	-	-	+	+	-
45	C	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	F	ST117	ND	-	-	-	+	+	+
46	C	ND ²	B1	ST1524	ND	+	-	-	+	+	+
47	C	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEML-171} , <i>bla</i> _{SHV-12}	A	ST6094	ND	+	-	-	+	+	-
48	C	<i>bla</i> _{TEML-278}	B1	ND	ND	+	-	+	+	+	-

¹ B: beef; P: pork; C: chicken ² ND: Not detected

Table S3.5. Phenotypic and genotypic characteristics of isolates from farm origin included in the study ($n=20$)

N°	Source ¹	β-lactamase genes	Phylogroup	MLST		Integrans			Insertion Sequence		
				Sequence type (ST)	Clonal complex (CC)	intI1	intI2	ISEcp1	IS26	IS903	ISCR1
1	S	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12}	B2	ST359	ND	-	-	-	+	-	-
2	S	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	B2	ST3333	ND	+	-	+	+	+	-
3	S	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-42}	A	ST10	ST10	+	-	+	+	+	-
4	S	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-42}	A	ST10	ST10	+	-	+	+	+	-
5	S	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	A	ST88	ST23	+	-	+	+	-	-
6	S	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-42}	A	ST88	ST23	+	-	+	+	+	-
7	S	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	B2	ST610	ND	+	-	+	+	-	-
8	S	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{SHV-12}	B2	ST891	ND	+	-	+	+	-	-
9	S	<i>bla</i> _{SHV-12}	B2	ST878	ND	-	-	-	+	-	-
10	S	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	B2	ST883	ND	+	-	+	+	-	-
11	S	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	B2	ST883	ND	+	-	+	+	-	-
12	S	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-42}	A	ST617	ST10	+	-	-	+	+	-
13	S	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B2	ST619	ST101	+	-	+	+	-	-
14	S	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-42} , <i>bla</i> _{SHV-1}	A	ST373	ST168	+	-	+	+	+	-
15	F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B1	ST3561	ND	+	-	+	+	-	-
16	F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B1	ST602	ST446	+	-	+	+	-	-
17	F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B1	ST446	ST446	+	-	+	+	+	-
18	F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	B1	ST446	ST446	+	-	+	+	-	-
19	F	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	A	ST88	ST23	+	-	+	+	-	-
20	F	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEML-171}	C	ND ²	ND	+	-	-	+	+	-

¹ S: farm soil; F: feed ² ND: Not detected

Table S3.6. Phenotypic and genotypic characteristics of isolates from healthy people ($n=13$)

N°	Sex ¹ /age range	β-lactamase genes	Phylogroup	MLST		Integrans			Insertion Sequence		
				Sequence type (ST)	Clonal complex (CC)	intI1	intI2	ISEcp1	IS26	IS903	ISCR1
1	M ₄₀₋₆₅	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-116}	B1	ST971	ND	+	-	-	+	+	-
2	F ₅₋₁₈	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-116}	A	ST2404	ND	+	-	-	+	+	+
3	F ₁₈₋₄₀	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEML-171}	D	ST38	ST38	+	-	-	+	+	-
4	F ₁₈₋₄₀	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEML-171}	ND	ND	ND	+	+	-	+	+	-
5	M ₁₈₋₄₀	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEML-171}	B2	ST131	ST13	+	-	+	+	-	-
6	F ₁₈₋₄₀	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	A	ND	ND	+	-	+	+	-	-
7	F ₁₈₋₄₀	<i>bla</i> _{TEML-171}	A	ND	ND	+	-	+	+	-	-
8	M ₄₀₋₆₅	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEML-171}	B2	ST131	ST131	+	-	+	+	-	-
9	M ₄₀₋₆₅	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEML-171}	B2	ST131	ST131	+	-	+	+	+	-
10	M _{>65}	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	B2	ST131	ST131	+	-	-	+	+	-
11	M ₅₋₁₈	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	B2	ST3483	ST131	+	-	-	+	+	-
12	F ₅₋₁₈	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	C	ND	ND	+	-	-	+	-	-
13	F _{>65}	ND ²	D	ND	ND	+	-	-	+	-	-

¹ F: Female; M: Male ² ND: Not detected

