



**Trabajo Fin de Máster**

# Análisis filogenético de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias

**Sarah Panera Martínez**

Máster Universitario en Bioinformática y Bioestadística

Área 4. Subárea 6: Microbiología, Biotecnología y Biología Molecular

Consultora: **Paloma Pizarro Tobías**

Profesor responsable de la asignatura: **Antoni Pérez Navarro**

Fecha Entrega: **Enero 2021**



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

## FICHA DEL TRABAJO FINAL

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>Título del trabajo:</b>     | <i>Análisis filogenético de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias</i> |
| <b>Nombre del autor:</b>       | <i>Sarah Panera Martínez</i>   |
| <b>Nombre del consultor/a:</b> | <i>Paloma María Pizarro Tobías</i>   |
| <b>Nombre del PRA:</b>         | <i>Antoni Pérez Navarro</i>  |
| <b>Fecha de entrega:</b>       | 01/2021  |
| <b>Titulación:</b>             | <i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i>   |
| <b>Área del Trabajo Final:</b> | <i>Microbiología, Biotecnología y Biología Molecular</i>   |
| <b>Idioma del trabajo:</b>     | <i>Español</i>   |
| <b>Palabras clave</b>          | <i>BLEE<br/>Resistencia a antibióticos<br/>Genómica comparada</i>                                  |

### Resumen:

El vertiginoso ritmo de aparición de bacterias resistentes a antibióticos supone un reto de vital importancia para el tratamiento de enfermedades infecciosas, tanto en medicina humana como veterinaria. Las BLEE son enzimas directamente relacionadas con la resistencia frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Existe gran variedad de estas proteínas, siendo las más abundantes las familias TEM, SHV y CTX-M. Con este estudio se pretende realizar un análisis filogenético con distintas cepas de enterobacterias en función de las BLEE más comunes. Para ello se ha seleccionado una proteína representativa de cada grupo (TEM-12, SHV-5 y CTX-M-9). Además, se ha realizado un estudio de genómica comparada relacionando estas filogenias con las obtenidas a partir del gen ARNr 16S. Para finalizar se realizó un análisis para determinar la localización de dichos genes de resistencia. Se analizaron un total de 25 cepas para la proteína TEM-12, 29 para la proteína SHV-5 y 44 para la proteína CTX-M-9, siendo en su mayoría secuencias contenidas en plásmidos. Las comparaciones filogenéticas realizadas con las enzimas de interés parecen no presentar un patrón claro de las relaciones evolutivas existentes. Sin embargo, al comparar estos árboles con los obtenidos para el gen ARNr 16S se observan claras diferencias, que permiten intuir mecanismos de transferencia horizontal. En conclusión, con los análisis realizados, se puede establecer que las enzimas estudiadas están codificadas por una única unidad transcripcional transferida a través de plásmidos y en función del nicho que ocupa cada grupo bacteriano o el tipo de infección que produce.

**Abstract:**

The increase in the rate of antibiotic-resistant bacteria represents an important challenge for the treatment of infectious diseases, both in human and veterinary medicine. ESBLs are enzymes directly related to resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. There are many types of these enzymes, but the most abundant groups are TEM, SHV and CTX-M families. This study aims to determine the phylogenetic relationship between different strains of Enterobacteriaceae based on different ESBLs. The analysis was made using a representative enzyme from each of the most important groups of ESBLs (TEM-12, SHV-5 and CTX-M-9). A comparative genomic study has been carried out relating these phylogenies with those obtained from the 16S rRNA gene. A gene location analysis was carried out in order to determine the distribution of these resistance genes. A total of 25 strains were analysed for TEM-12, 29 strains for SHV-5 and 44 strains for CTX-M-9, many of these sequences were in plasmids. Phylogenetic comparisons made with these enzymes do not show a clear pattern of evolutionary relationships. However, when comparing these phylogenetic trees with those obtained with the 16S rRNA gene, clear differences are observed. Those alterations represent mechanisms of horizontal gene transmission. In conclusion, all the analyses carried out in this study prove that these enzymes are encoded by a single transcriptional unit which is transferred through plasmid. This transmission is related to the environmental conditions where each bacterium can live and the type of infection that it produces.

# Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción.....  | 1  |
| 1.1 Contexto y justificación del Trabajo.....                   | 1  |
| 1.2 Betalactamasas de espectro extendido.....                   | 2  |
| 1.3 Enterobacterias y betalactamasas .....                      | 3  |
| 1.4 Tipos de BLEE en enterobacterias.....                       | 4  |
| 1.5 Objetivos del Trabajo.....                                  | 5  |
| 2. Material y métodos .....                                     | 6  |
| 2.1 Enfoque y método seguido.....                               | 6  |
| 2.2 Planificación del Trabajo .....                             | 7  |
| 2.3 Breve resumen de productos obtenidos .....                  | 8  |
| 2.4 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria..... | 8  |
| 3. Resultados .....   | 10 |
| 3.1 Secuencias obtenidas .....                                  | 10 |
| 3.2 Árboles filogenéticos .....                                 | 10 |
| 3.2 Comparación de filogenias con el gen ARNr 16S .....         | 14 |
| 3.3 Análisis de localización génica .....                       | 17 |
| 4. Discusión.....   | 19 |
| 4.1 Secuencias obtenidas .....                                  | 19 |
| 4.2 Árboles filogenéticos .....                                 | 20 |
| 4.3 Comparación de filogenias con el gen ARNr 16S .....         | 21 |
| 4.4 Análisis de localización génica .....                       | 23 |
| 5. Conclusiones.....  | 23 |

|  |    |
|--|----|
| 5.1 Análisis crítico del trabajo.....  | 24 |
| 6. Glosario.....   | 25 |
| 7. Bibliografía.....   | 26 |
| 8. Anexos.....   | 32 |
| 8.1 Anexo I: Secuencias nucleotídicas de las proteínas de estudio.....                                 | 32 |
| 8.2 Anexo II: Árboles filogenéticos junto con distancias evolutivas.....                               | 33 |
| 8.3 Anexo III: Representación gráfica de los árboles filogenéticos realizados con el gen ARNr 16S..... | 37 |
| 8.4 Anexo IV: Script de RStudio para la comparación entre árboles.....                                 | 40 |

### Lista de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Diagrama de Gantt.....                                   | 9  |
| <b>Figura 2.</b> Relaciones evolutivas enzima TEM-12.....                 | 11 |
| <b>Figura 3.</b> Relaciones evolutivas enzima SHV-5.....                  | 12 |
| <b>Figura 4.</b> Relaciones evolutivas enzima CTX-M-9.....                | 13 |
| <b>Figura 5.</b> Comparación TEM-12 y ARNr 16S.....                       | 14 |
| <b>Figura 6.</b> Comparación SHV-5 y ARNr 16S.....                        | 15 |
| <b>Figura 7.</b> Comparación CTX-M-9 y ARNr 16S.....                      | 16 |
| <b>Figura 8.</b> Resultados búsqueda de operones TEM-12.....              | 17 |
| <b>Figura 9.</b> Resultados búsqueda de operones SHV-5.....               | 18 |
| <b>Figura 10.</b> Resultados búsqueda de operones CTX-M-9.....            | 18 |
| <b>Figura 11.</b> Relaciones evolutivas gen ARNr 16S (cepas TEM-12).....  | 37 |
| <b>Figura 12.</b> Relaciones evolutivas gen ARNr 16S (cepas SHV-5).....   | 38 |
| <b>Figura 13.</b> Relaciones evolutivas gen ARNr 16S (cepas CTX-M-9)..... | 39 |

# 1. Introducción

## 1.1 Contexto y justificación del Trabajo

Desde los primeros estudios en el campo de la microbiología la posibilidad de que un organismo interfiera, positiva o negativamente, en el crecimiento de otro ha sido objeto de intensa investigación (1). A principios del siglo pasado con el descubrimiento de los antibióticos se inició un periodo transcendental para la innovación e implementación de medicamentos, tanto en la salud humana y animal como en la agricultura (2). Este hito ha supuesto un importante descenso de los fallecimientos debido a enfermedades infecciosas, además de contribuir a aumentar la esperanza de vida humana (3).

El descubrimiento de los antibióticos se atribuye a Alexander Fleming, quien en 1928 observó que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se inhibía en presencia del hongo *Penicillium notatum* (4) (5). Este hongo producía una sustancia, caracterizada posteriormente como penicilina, capaz de inhibir el crecimiento de algunas bacterias disolviendo su pared celular (1). A raíz de este descubrimiento, se identificaron multitud de compuestos diferentes pero con una estructura común (todos tenían un anillo  $\beta$ -lactámico) y mecanismo de acción similar (6). La acción bactericida de los  $\beta$ -lactámicos se relaciona con la inhibición de la síntesis de peptidoglucano (componente indispensable de la pared bacteriana) y la activación de un sistema de enzimas líticos implicados en la degradación de la pared celular (7).

Gracias a la gran diversidad de moléculas  $\beta$ -lactámicas y su respectiva potencia antibacteriana este tipo de medicamentos siguen siendo, hoy en día, los más utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas (8). Sin embargo, en las últimas décadas, la eficacia de estos medicamentos ha sido eclipsada por la aparición y propagación de microbios resistentes a ellos. En la actualidad, la resistencia a antibióticos es un tema de gran relevancia para la sociedad, ya que supone una fuerte amenaza para la salud a nivel mundial e involucra a los principales patógenos (5).

La preocupación por la aparición de microorganismos resistentes a antibióticos ha ido en aumento en las últimas décadas, llegando a definirse como una pandemia mundial (9), como uno de los principales desafíos sanitarios del siglo XXI (10) e incluso, como una posible catástrofe global (11). El problema asociado a dichas resistencias es tan grave que algunos modelos logísticos estiman que durante el siglo XXI la tasa de mortalidad, debida a infecciones bacterianas, podría llegar a alcanzar progresivamente los mismos niveles que hace un siglo (12).

La resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que precede a la presión selectiva moderna del uso clínico de estos medicamentos (2). Sin embargo, el vertiginoso ritmo de aparición de cepas bacterianas con múltiples resistencias se relaciona con el uso excesivo o inadecuado de antimicrobianos (5). Algunos estudios establecen además, un vínculo directo entre el uso de antibióticos para tratar enfermedades en el ganado y la aparición de patógenos resistentes en humanos (13). El tratamiento con antibióticos para mejorar la salud y la productividad de los animales sigue siendo una práctica muy extendida en la industria ganadera (14), llegando incluso a utilizarse como complementos alimenticios o promotores del crecimiento (15).

## **1.2 Betalactamasas de espectro extendido**

La resistencia a antibióticos betalactámicos puede atribuirse a diferentes mecanismos de acción, como la distribución de la permeabilidad del antibiótico por alteración de porinas en la membrana celular bacteriana o por modificación química del sitio de acción del antibiótico (16). Sin embargo, el mecanismo más importante desde el punto de vista terapéutico es la resistencia bioquímica debida a la producción de unas enzimas conocidas como betalactamasas (17). Estas enzimas son compuestos catalíticos de naturaleza proteica, cuya producción está controlada por genes cromosómicos o transferidos por plásmidos y transposones (16). El mecanismo de acción de estas moléculas consiste en romper el anillo betalactámico de los antibióticos, evitando la inhibición de síntesis de peptidoglucano y la destrucción de la propia pared celular de las bacterias (18).



Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación (15) (19). Estas enzimas fueron descritas por primera vez en la década de 1980 y desde entonces se han detectado sobre todo en cepas de *Klebsiella*, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Serratia*, además de otros bacilos gram-negativos (20). Los mecanismos sobre la diseminación de BLEE son todavía algo confusos, sin embargo, la aparición de bacterias portadoras de estos genes de resistencia ha aumentado vertiginosamente en todo el mundo (21). En los últimos años, se han llegado a identificar más de 600 variantes diferentes de BLEE, pertenecientes a distintas familias proteicas (22). Además, se han encontrado cepas productoras de estas enzimas en diferentes nichos: infecciones bacterianas en humanos y animales, portadores fecales y aguas residuales, productos de origen alimentario (cocinados y crudos) y granjas de animales para la producción de alimentos (23).

### **1.3 Enterobacterias y betalactamasas**

Las BLEE son producidas principalmente por microorganismos del grupo de las enterobacterias capaces de inhibir la acción de los compuestos betalactámicos (17), asociándose a distintos brotes de infecciones alimentarias y nosocomiales, producidas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia* o *Salmonella*, entre otras (24) (25). La aparición de infecciones nosocomiales producidas por enterobacterias portadoras de genes BLEE sigue una tendencia exponencial en todo el mundo y, por lo general, suelen asociarse a un peor pronóstico debido a la dificultad de tratamiento con antibióticos (26).

Por otro lado, las enterobacterias de origen animal, en particular *Escherichia coli*, pueden ser patógenas para los seres humanos y, además, actuar como donantes de genes de resistencia a otros patógenos con los que comparten nicho (21). Sin embargo, en muchos casos, las cepas portadoras de estas resistencias antimicrobianas no son patógenas y, a priori no revisten de gravedad para la salud pública. El problema aparece cuando, gracias a la transferencia horizontal que presentan las bacterias, dichos genes son recibidos por cepas con cierto potencial patogénico (27).

#### 1.4 Tipos de BLEE en enterobacterias

Hasta la fecha, se han descrito gran variedad de BLEE diferentes, existiendo diversos tipos de agrupaciones en función de su estructura (clase molecular), actividad (grupo y subgrupo funcional) y sus características, como por ejemplo la descrita por Bush, Jacoby y Medeiros (28). Sin embargo, otras clasificaciones agrupan estas betalactamasas de espectro extendido en función del grupo o familia proteica a la que pertenecen. Algunas de las familias más características de estas enzimas son las siguientes:

- BLEE de tipo TEM: Son enzimas normalmente codificadas en plásmidos y, por lo tanto, con capacidad de ser transferidas a otras bacterias por conjugación. Actualmente, se han descrito más de 160 tipos diferentes de BLEE pertenecientes a esta familia (29). Este tipo de enzimas suele estar asociado a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a penicilina y causantes de brotes o infecciones de origen nosocomial (30).
- BLEE tipo SHV: En este caso, las proteínas SHV también suelen asociarse a regiones plasmídicas, otorgándoles gran capacidad de dispersión entre microorganismos. Además, estas enzimas tienen una estructura y composición aminoacídica muy similar a las BLEE de la familia TEM (20). Pero son enzimas directamente relacionadas con la resistencia a ampicilina (31).
- BLEE tipo CTX-M: Este tipo de proteínas están codificadas por genes de historia evolutiva distinta, tanto plásmidos como cromosomas (32). Aunque las familias TEM y SHV son los tipos principales de BLEE, las pertenecientes al grupo CTX-M son las de mayor reporte mundial, o al menos así son consideradas en muchos países (20). Este tipo de enzimas se asocian directamente a la resistencia a la cefotaxima (32).
- Otras familias de BLEE: Además de estos tres grupos principales, existen otras familias, aun menos descritas, pero de gran importancia en la resistencia a antibióticos betalactámicos: OXA, PER, VEB, BES, SFO, TLA, CME, GES/IBS... (29).

## 1.5 Objetivos del Trabajo

El principal problema que se plantea con el desarrollo del presente Trabajo Fin de Máster es el vertiginoso ritmo de aparición de resistencias a antibióticos betalactámicos. Para entender cómo se producen dichas resistencias y teniendo en cuenta los mecanismos de transmisión de genes que presentan los microorganismos, resulta de vital importancia realizar un estudio de genómica comparada y para ello se han establecido dos objetivos generales, desglosados en diferentes objetivos específicos:

1. Identificar las principales enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y seleccionar genes implicados en la producción de dichas enzimas.
  - b. Determinar y seleccionar, a partir de la bibliografía, los genes esenciales para generar resistencia a antibióticos betalactámicos en enterobacterias.
  - c. Obtener las secuencias de los genes anteriormente elegidos mediante bases de datos y navegadores genómicos.
2. Estudiar y comparar los genes implicados en la producción de betalactamasas de espectro extendido en las distintas cepas de enterobacterias seleccionadas.
  - a. Comparar las secuencias de los genes relacionados con la resistencia, mediante alineamientos de secuencias múltiples.
  - b. Determinar las relaciones existentes entre las cepas bacterianas a través de árboles filogenéticos.
  - c. Comparar los resultados obtenidos para los genes de interés con los obtenidos para el gen ARNr 16S.
  - d. Relacionar los resultados obtenidos con la localización de los genes de resistencia y el tipo de infección producida.

## 2. Material y métodos

### 2.1 Enfoque y método seguido

#### Identificación de genes implicados en la resistencia a betalactámicos

Inicialmente, se ha realizado un estudio bibliográfico para la identificación de las principales cepas de enterobacterias productoras de BLEE y para determinar los principales genes de interés relacionados con la producción de BLEE. Se han seleccionado 3 enzimas para establecer las relaciones evolutivas entre las distintas cepas de enterobacterias, correspondiéndose con las familias de proteínas BLEE más comunes y mejor descritas:

- TEM: Se ha seleccionado la proteína TEM-12, porque es una de las variantes de BLEE más comunes en Estados Unidos. La cepa bacteriana de referencia para esta betalactamasa se corresponde con la especie *Klebsiella oxytoca*.
- SHV: Se ha seleccionado la proteína SHV-5, una de las BLEE más comunes en el Europa y Estados Unidos. La secuencia nucleotídica se ha obtenido a partir de la cepa de referencia *Klebsiella pneumoniae*.
- CTX-M: En este caso se ha seleccionado la proteína CTX-M-9, una de las BLEE más comunes y normalmente descrita en cepas de *Escherichia coli* (utilizada como secuencia de referencia).

Con estas tres enzimas (**Anexo I**) se ha realizado una búsqueda de secuencias homólogas, utilizando la herramienta BLAST (33). Se seleccionaron aquellas con un porcentaje de coincidencia con la secuencia patrón mayor al 99,8%. Una vez identificadas dichas secuencias se descargaron desde el NCBI (34) en formato FASTA para su posterior procesado. Las comparaciones de secuencias se realizaron estableciendo las relaciones filogenéticas entre las distintas cepas seleccionadas. Para ello, se realizó un alineamiento de secuencias múltiples con el software MEGAX (35). Esta técnica asume que las secuencias que se están alineando descienden de un antepasado común y, por lo tanto, se intentan alinear las posiciones homólogas (**Anexo II**).

Paralelamente, se ha realizado un estudio de comparación génica mediante construcción de árboles filogenéticos para el gen ARNr 16S. Se obtuvieron todas las secuencias nucleotídicas disponibles del gen ARNr 16S de las cepas analizadas en los tres casos planteados (**Anexo III**). La elaboración de los análisis filogenéticos se realizó mediante un alineamiento múltiple con todas las secuencias ARNr 16S y construyendo los correspondientes árboles filogenéticos con el software MEGAX (35). Para la elaboración de los árboles filogenéticos, tanto en el caso de los basados en las enzimas BLEE como en el gen ARNr 16S, se ha utilizado el método de “Neighbor-joining” (36). Esta técnica no asume reloj molecular y, por lo tanto, permite una representación más real de la distancia evolutiva entre las secuencias analizadas que otros algoritmos similares. Por otro lado, para realizar la comparación entre árboles se ha utilizado el paquete Ape de RStudio (37) (**Anexo IV**).

Finalmente, para terminar la parte experimental del trabajo, se ha realizado un análisis de localización genética para determinar cómo se distribuyen los genes que codifican las proteínas TEM-12, SHV-5 y CTX-M-9. Para ello, se han buscado las secuencias nucleotídicas utilizando el software Fgenesh (38), permitiendo determinar si dichas proteínas están codificadas por operones o por un único gen y en el caso de estar codificadas por operones poder realizar las comparaciones pertinentes.

## **2.2 Planificación del Trabajo**

Los objetivos planteados se desglosan en una serie de tareas diferentes a las que se le asigna una duración determinada. La temporalización del proyecto se representa en un diagrama de Gantt (**Figura 1**). Es importante destacar los principales hitos que han ido marcando la planificación del proyecto:

- Revisión bibliográfica: sin este primer paso de búsqueda bibliográfica y selección de cepas y proteínas de interés, es imposible continuar con el correcto desarrollo del trabajo, ya que no tendría donde sustentarse.
- Obtención y análisis de secuencias: el correcto procesado de las secuencias descargadas es esencial para avanzar en las comparaciones.

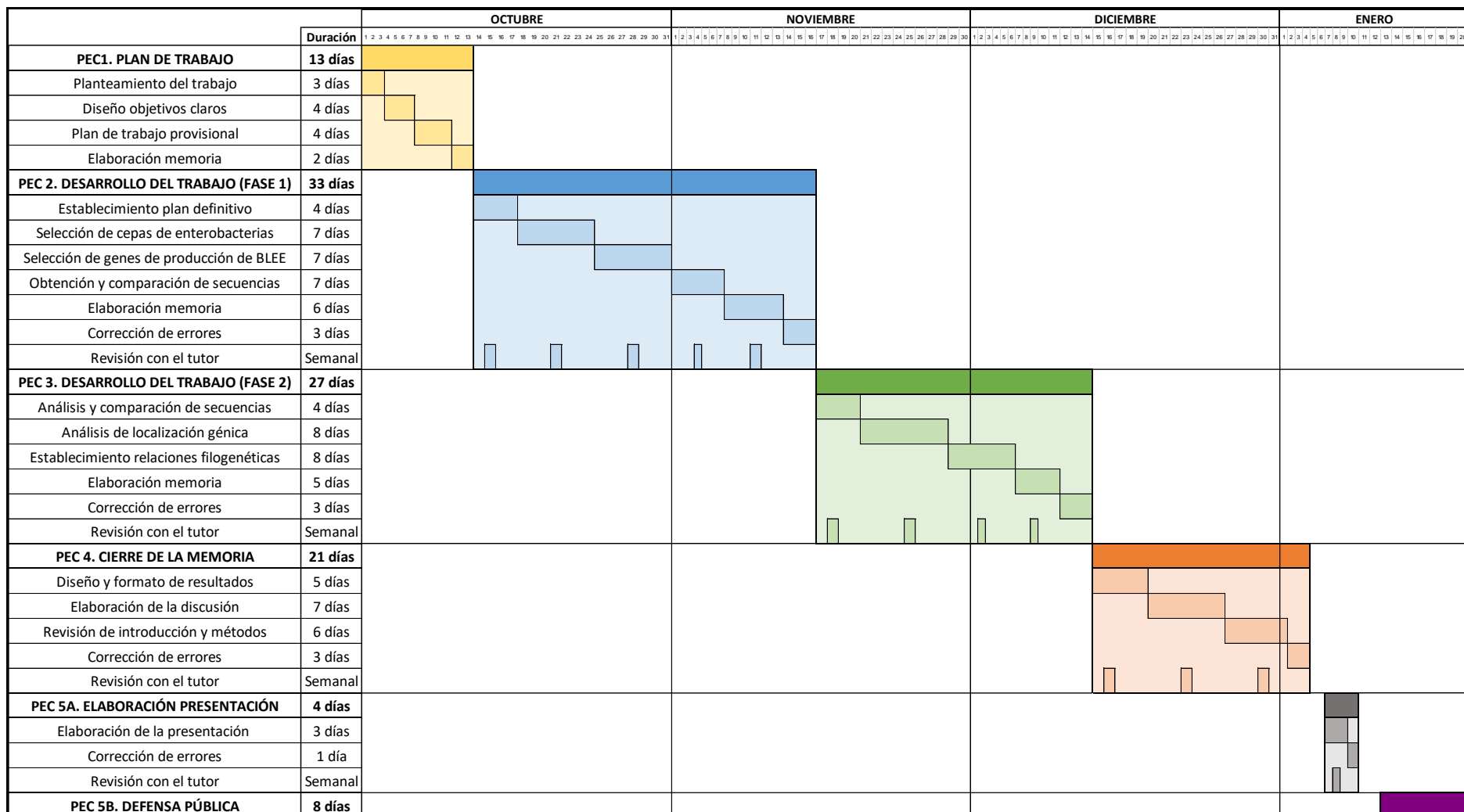
- Comparación de secuencias y establecimiento de relaciones filogenéticas: sin la realización de estas dos tareas no se podrían presentar unos resultados coherentes ni habría forma alguna de discutirlos.
- Análisis de localización génica: sin este paso no se puede comprobar cómo se distribuyen los genes de interés y, por lo tanto, el desarrollo final del trabajo quedaría incompleto.

### **2.3 Breve resumen de productos obtenidos**

Los productos obtenidos con la elaboración del presente Trabajo Fin de Máster son los diferentes árboles filogenéticos. Con su realización se pueden establecer las relaciones evolutivas entre los grupos taxonómicos analizados (pertenecientes a la familia de las enterobacterias). Se han obtenido 6 árboles diferentes, uno para cada familia de BLEE analizada (TEM, SHV y CTX-M) y otros 3 correspondientes a las comparaciones realizadas con el gen ARNr 16S (también uno para cada tipo de BLEE analizada). Además, en el último apartado de resultados se incluye un análisis de localización génica en el que se detalla la distribución de los genes que codifican las proteínas de interés.

### **2.4 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria**

La memoria del trabajo consta de 8 capítulos diferentes. El primero se corresponde con la introducción al tema, que contiene el marco contextual que permite presentar el estudio. El capítulo 2 se corresponde con material y métodos, donde se exponen los aspectos más relevantes sobre la metodología y acciones llevadas a cabo. En el tercer capítulo se exponen los resultados derivados del trabajo experimental, mientras que en el 4 y 5 se realiza una discusión de los resultados y se establecen las conclusiones a las que se llega con la realización del estudio, respectivamente. El capítulo 6 se corresponde con un glosario de términos y el 7 con la bibliografía consultada. Finalmente, el último capítulo contiene los anexos, con figuras y tablas relevantes obtenidas durante el proceso de elaboración de la memoria.



**Figura 1.** Diagrama de Gantt con la planificación y temporalización establecidas para la realización del presente Trabajo Fin de Máster. Cada PEC se marca de un color diferente, señalando de tonos más intensos los días correspondientes a cada una de las tareas especificadas a la izquierda del cronograma.

## 3. Resultados

### 3.1 Secuencias obtenidas

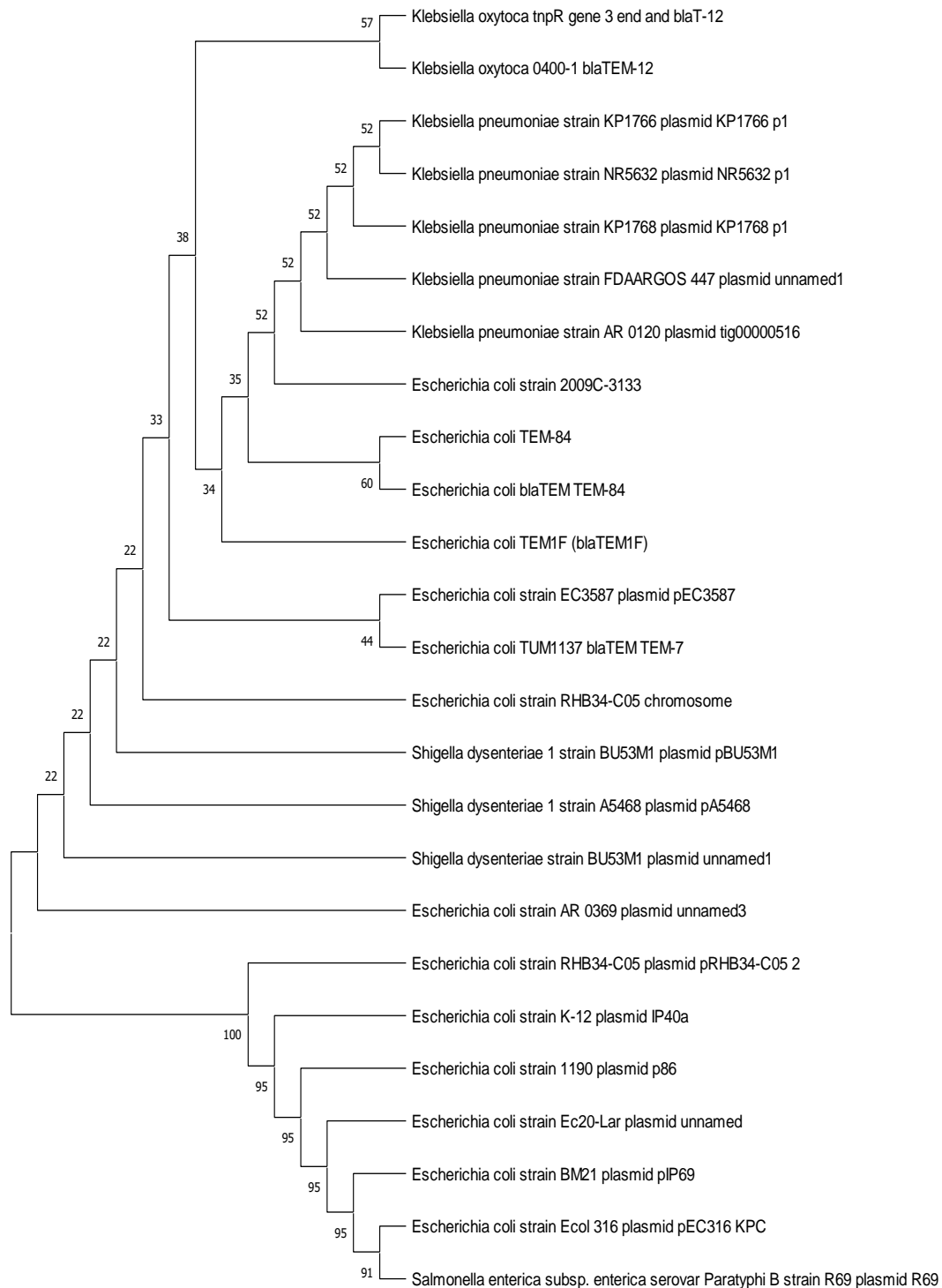
Como resultado de las búsquedas de secuencias homólogas se han obtenido un total de 25 secuencias para las comparaciones de la proteína TEM-12, 29 para la proteína SHV-5 y 44 para la proteína CTX-M-9. Las betalactamasas de espectro extendido son proteínas con un entorno genético poco específico y que, además, pueden coexistir en distintos elementos móviles. Por este motivo, las búsquedas de secuencias homólogas devuelven muchos resultados con un alto grado de porcentaje de identidad. Es por esto por lo que se seleccionaron únicamente aquellas con un porcentaje de identidad superior al 99,8%.

### 3.2 Árboles filogenéticos

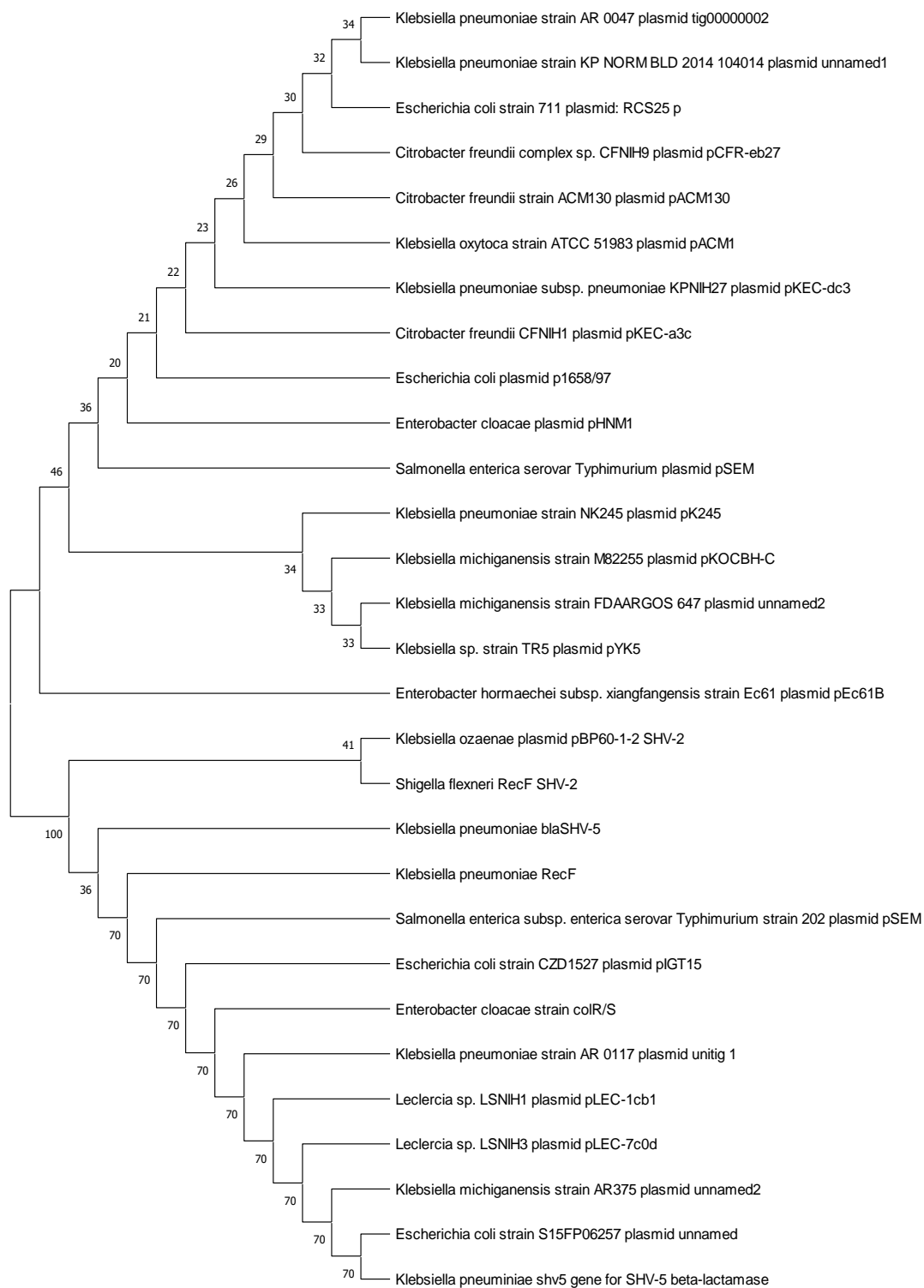
El árbol filogenético resultante de comparar el gen TEM-12 (**Figura 2**), muestra dos ramas diferenciadas, una en la que se agrupan genes codificados en plásmidos de *E. coli* y *Salmonella* y otra en la que se agrupan, sobre todo, genes contenidos en plásmidos de *Klebsiella pneumoniae* y *Shigella dysenteriae* y genes cromosómicos de *E. coli* y *Klebsiella oxytoca*. En el árbol generado para el gen SHV- 5 (**Figura 3**) también se distribuyen los taxones en dos ramas principales, pero esta vez sin una distribución tan clara como en el caso anterior. Sin embargo, en este caso, las 3 cepas que tienen un origen cromosómico se encuentran dentro de la misma rama del árbol. Finalmente, en el tercer árbol, las relaciones se establecen en función del gen CTX-M-9 (**Figura 4**). En una de las ramas sólo se agrupan un plásmido de *E. coli* y otro de *Enterobacter*. Sin embargo, la segunda rama se subdivide en otras dos diferentes, una en la que se agrupan, sobre todo cepas de *E.coli* y *Enterobacter* y otra con cepas de *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Leclercia*.

En ninguno de los tres casos se observa un patrón claro de las relaciones evolutivas que pueda haber entre las distintas cepas estudiadas. Sin embargo, sí se observa un elevado número de cepas o secuencias de nucleótidos asociadas con plásmidos, mientras que la aparición de este tipo de proteínas (TEM, SHV y CTX-M) en secuencias cromosómicas es muy poco frecuente.

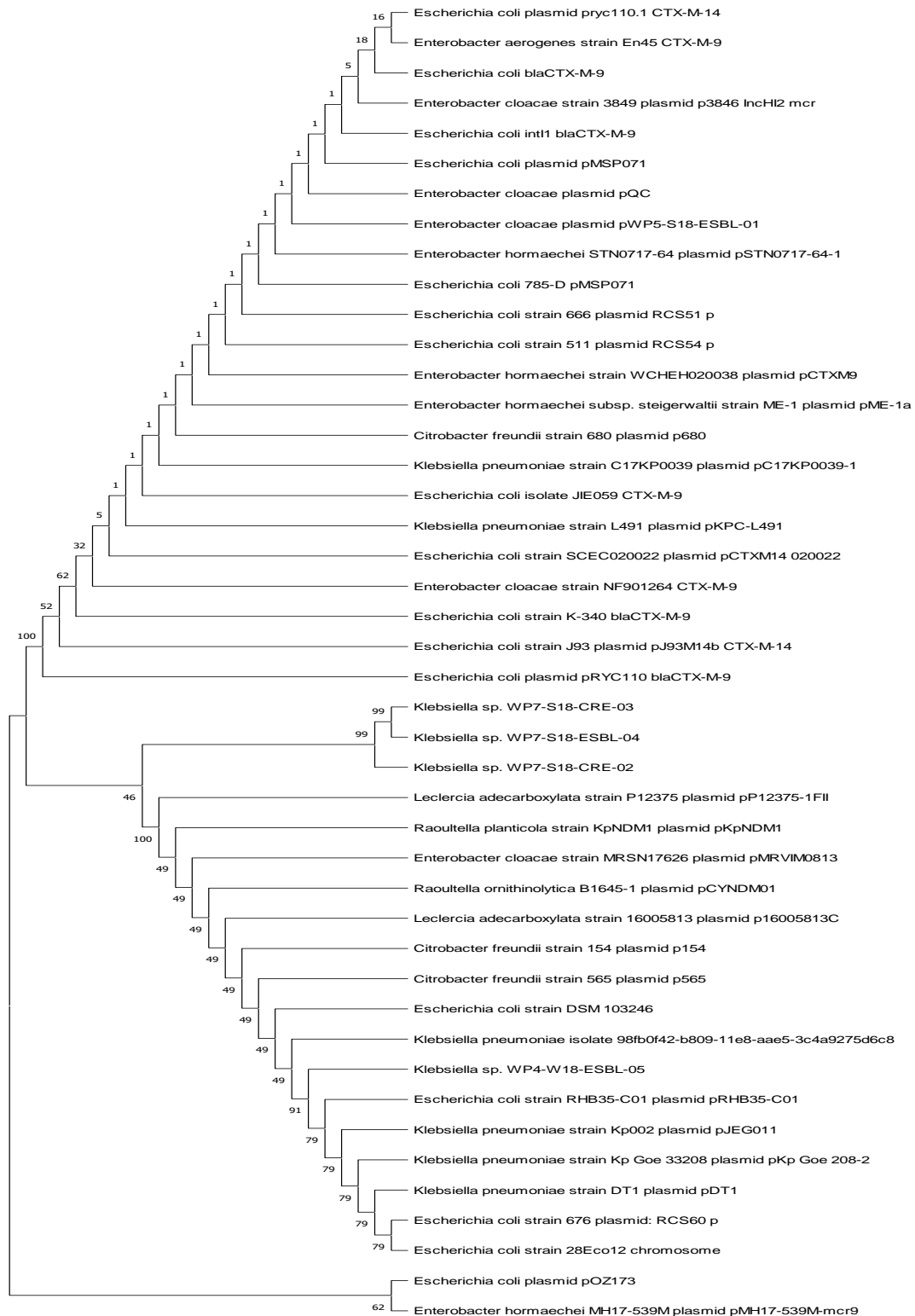




**Figura 2.** Relaciones evolutivas entre taxones de enterobacterias basadas en la enzima TEM-12 (asociado a la producción de una betalactamasa de espectro extendido) inferidas mediante el método de Neighbor-Joining (36). El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (39). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Maximum Composite Likelihood (40). Este análisis involucró a 25 secuencias de nucleótidos y todas las posiciones ambiguas fueron eliminadas para cada par de secuencias. El dataset final contiene 1178 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo con el Software MEGA X (35).



**Figura 3.** Relaciones evolutivas entre taxones de enterobacterias basadas en la enzima SHV-5 (asociado a la producción de una betalactamasa de espectro extendido) inferidas mediante el método de Neighbor-Joining (36). El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (39). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Maximum Composite Likelihood (40). Este análisis involucró a 29 secuencias de nucleótidos y todas las posiciones ambiguas fueron eliminadas para cada par de secuencias. El dataset final contiene 1113 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo con el Software MEGA X (35).

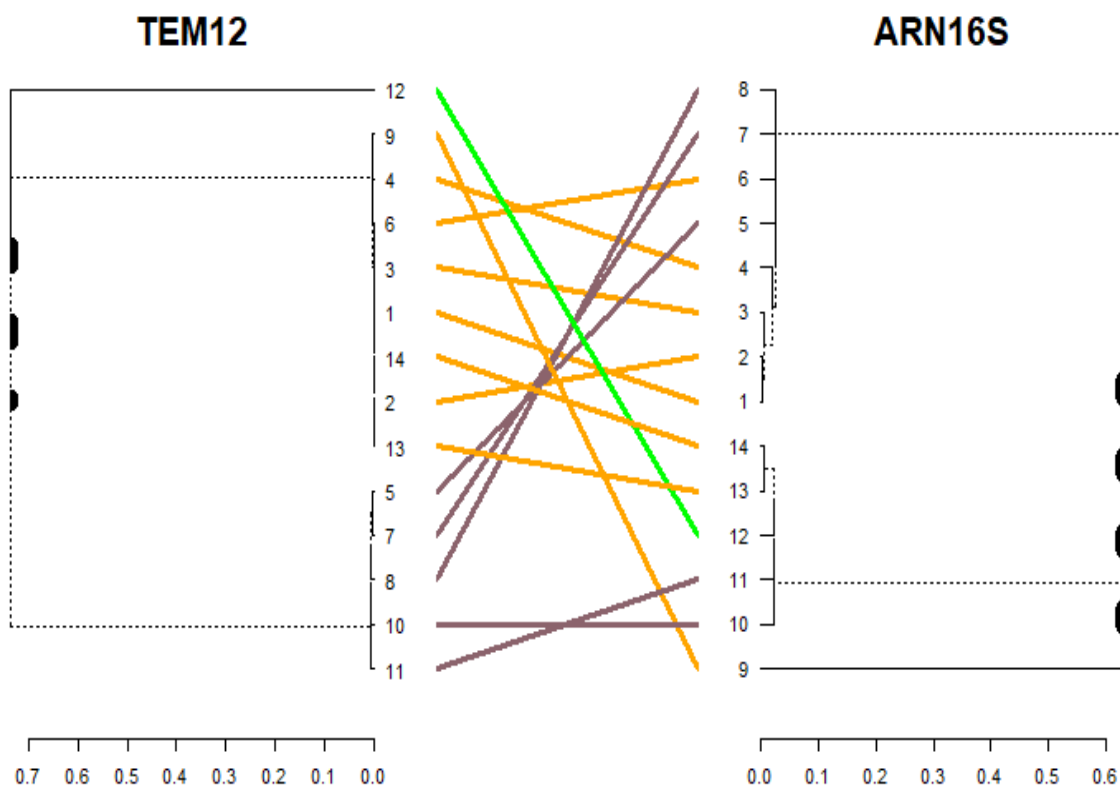


**Figura 4.** Relaciones evolutivas entre taxones de enterobacterias basadas en la enzima CTX-M-9 (asociado a la producción de una betalactamasa de espectro extendido) inferidas mediante el método de Neighbor-Joining (36). El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (39). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Maximum Composite Likelihood (40). Este análisis involucró a 44 secuencias de nucleótidos y todas las posiciones ambiguas fueron eliminadas para cada par de secuencias. El dataset final contiene 1076 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo con el Software MEGA X (35).

### 3.2 Comparación de filogenias con el gen ARNr 16S

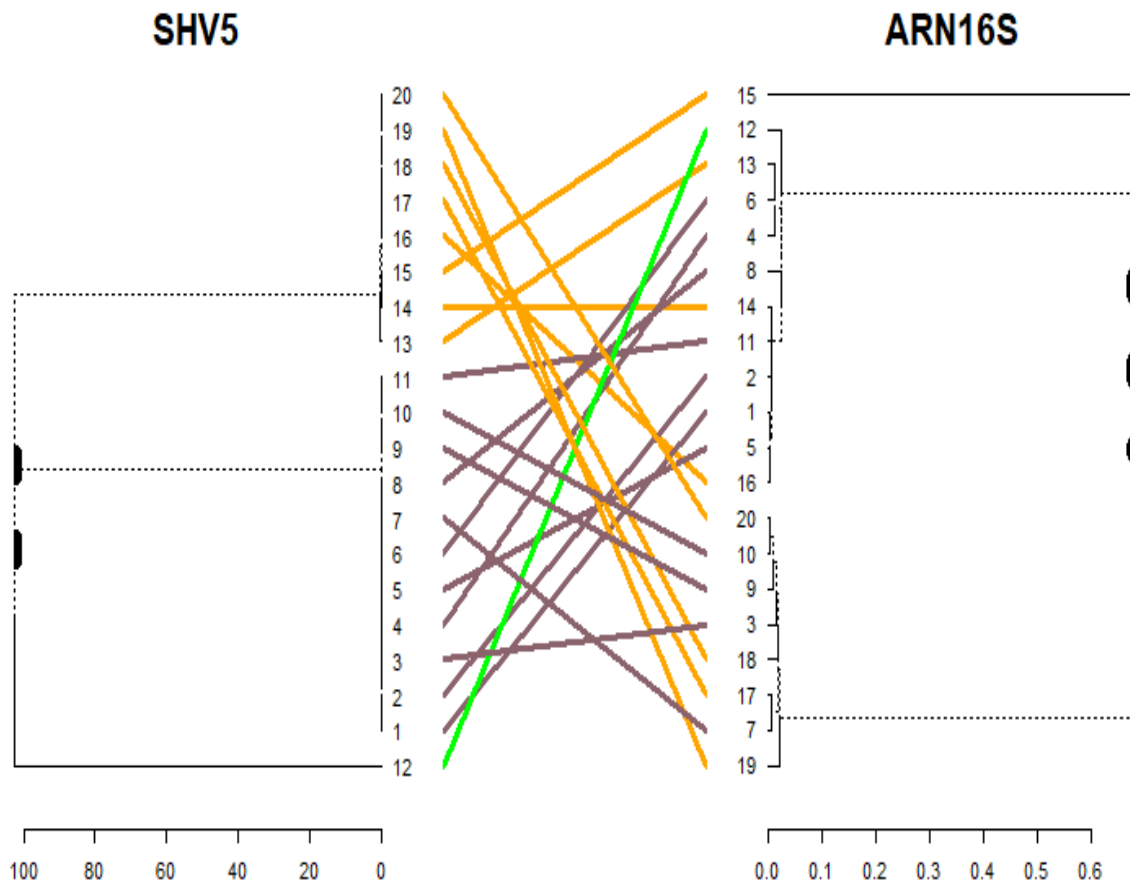
Además, se han comparado los resultados obtenidos en cada uno de estos árboles filogenéticos con los obtenidos a partir del gen del ARNr 16S (**Anexo III, Figura 11****Figura 12****Figura 13**). En muchos casos, la secuencia analizada se sitúa en plásmidos de cepas para las que no hay secuencia cromosómica en las bases de datos, por lo que las imágenes comparativas se han simplificado.

La primera comparación se ha realizado para el árbol filogenético obtenido con la proteína TEM-12 y el gen ARNr 16S (**Figura 5**). La comparación muestra diferencias claras entre ambos árboles. De manera que en el árbol obtenido para la proteína TEM-12, las cepas bacterianas se agrupan de la siguiente manera: por un lado las pertenecientes al género *Klebsiella* y por otro lado *E. coli*. Sin embargo, en el árbol correspondiente al gen ARNr 16S presenta agrupamientos totalmente diferentes y sin dicha distribución tan clara.



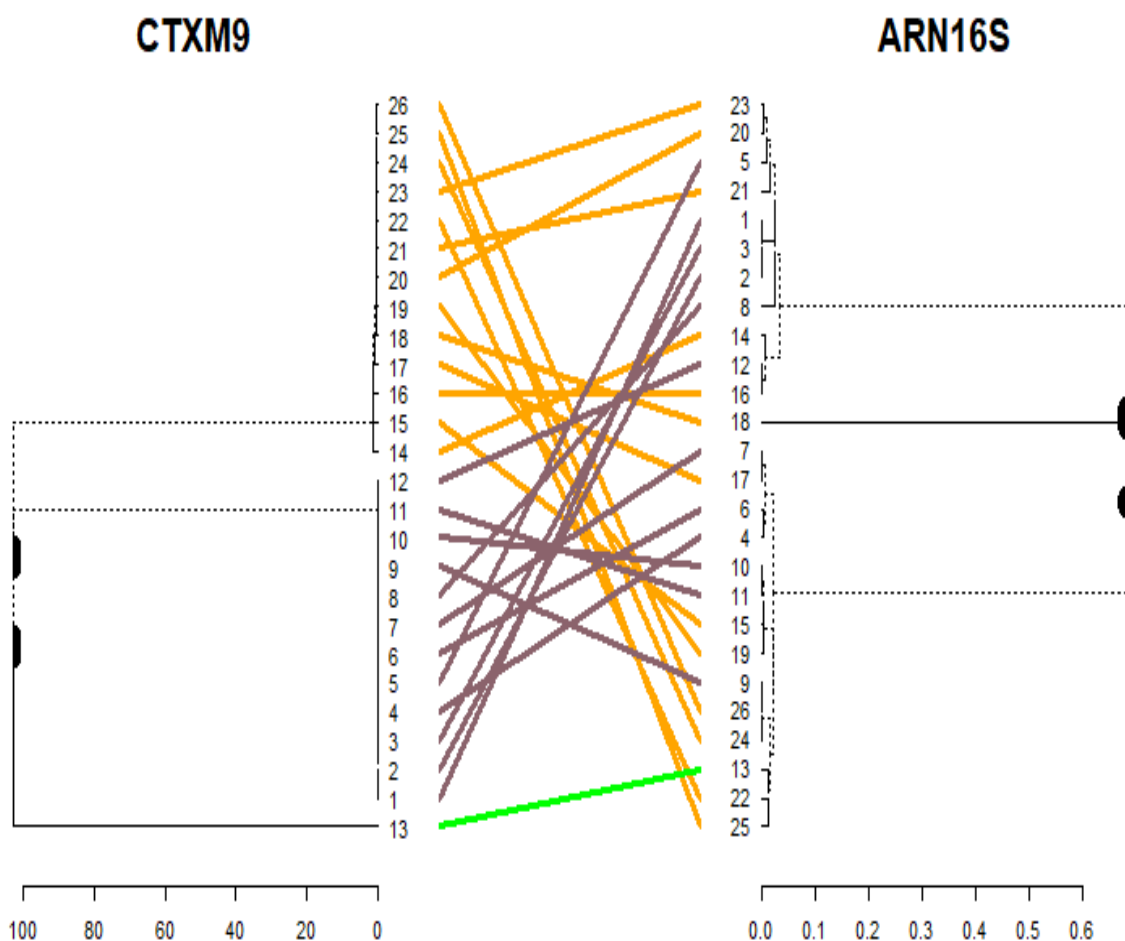
**Figura 5.** Comparación de los árboles filogenéticos correspondientes a los genes TEM-12 y ARNr 16S. Se ha realizado con el paquete Ape de Rstudio (37). Cada cepa se ha sustituido por un valor numérico: **1.** *K. pneumoniae* FDAARGOS\_447, **2.** *K. pneumoniae* NR5632, **3.** *K. pneumoniae* AR\_0120, **4.** *K. oxytoca*, **5.** *Salmonella* entérica, **6.** *E. coli* 2009C-3133, **7.** *E. coli* 316, **8.** *E. coli* 1190, **9.** *Shigella dysenteriae*, **10.** *E. coli* K-12, **11.** *E. coli* RHB34-C05, **12.** *E. coli* AR0369, **13.** *K. pneumoniae* KP1766 y **14.** *K. pneumoniae* KP1768.

La segunda comparación se ha realizado para el árbol filogenético obtenido con la proteína SHV-5 y el ARNr 16S (**Figura 6**). En este caso las diferencias observadas entre ambos árboles no son tan claras como en el anterior, aunque sí resultan evidentes. Se puede apreciar como en el árbol del gen ARNr 16S los grupos obtenidos están distribuidos en dos grupos más homogéneos. En una de las ramas se agrupan predominantemente cepas de *K. michiganensis* y *Enterobacter*, mientras que en la otra aparecen sobre todo cepas de *K. pneumoniae*. A priori, en el árbol generado a partir del gen SHV-5 las cepas no se distribuyen con lógica aparente, ya que microorganismos pertenecientes a la misma especie bacteriana (*K. michiganensis*) aparecen en ramas distintas.



**Figura 6.** Comparación de los árboles filogenéticos correspondientes a los genes SHV-5 y ARNr 16S. Se ha realizado con el paquete Ape de Rstudio (37). Cada cepa se ha sustituido por un valor numérico: **1.** *K. pneumoniae* AR0047, **2.** *K. pneumoniae* NORM, **3.** *Citrobacter freundii*, **4.** *K. oxytoca*, **5.** *K. pneumoniae* KPNIH27, **6.** *Citrobacter freundii* CFNIH1, **7.** *Enterobacter cloacae*, **8.** *Salmonella enterica*, **9.** *K. michiganensis* M82255, **10.** *K. michiganensis* FDAARGOS\_647, **11.** *Klebsiella* sp. TR5, **12.** *Enterobacter hormaechei*, **13.** *Leclercia* sp. LSNIH3, **14.** *K. ozaenae*, **15.** *Shigella flexneri*, **16.** *K. pneumoniae*, **17.** *Enterobacter cloacae* colR/S, **18.** *K. pneumoniae* AR0117, **19.** *Leclercia* sp. LSNIH1 y **20.** *K. michiganensis* AR375

Finalmente, se ha realizado la comparación de los árboles obtenidos con la proteína CTM-X-9 y el ARNr 16S (**Figura 7**). Esta comparativa muestra diferencias claras en cuanto a la organización de las cepas en grupos microbianos. El árbol filogenético para el gen 16S rRNA muestra varias agrupaciones claras, en las que solo se encuentran microorganismos del mismo género, como es el caso de *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* o *Escherichia*. Sin embargo, el árbol obtenido para la proteína CTX-M-9 no muestra esta agrupación tan clara.



**Figura 7.** Comparación de los árboles filogenéticos correspondientes a los genes CTX-M-9 y ARNr 16S. Se ha realizado con el paquete Ape de Rstudio (37). Cada cepa se ha sustituido por un valor numérico: **1.** *Klebsiella* sp. WP7-S18-CRE-02, **2.** *Klebsiella* sp. WP7-S18-CRE-03, **3.** *Klebsiella* sp. WP7-S18-ESBL-04, **4.** *E. cloacae* 3849, **5.** *E. cloacae*, **6.** *E. hormaechei* STN0717-64, **7.** *E. hormaechei* WCHEH020038, **8.** *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*, **9.** *Citrobacter freundii* 680, **10.** *K. pneumoniae* C17KP0039, **11.** *K. pneumoniae* L491, **12.** *E.coli* SCEC020022, **13.** *E. aerogenes*, **14.** *E. coli* RHB35-C01, **15.** *K. pneumoniae* Goe33208, **16.** *E. coli* 28Eco12, **17.** *E. hormaechei*, **18.** *E. coli* DSM 103246, **19.** *K. pneumoniae*, **20.** *Leclercia adecarboxylata* P12375, **21.** *Raoultella planticola*, **22.** *Raoultella ornithinolytica*, **23.** *Leclercia adecarboxylata* 16005813, **24.** *Citrobacter freundii* 154, **25.** *Klebsiella* sp. WP4-W18-ESBL-05 y **26.** *Citrobacter freundii* 565h

### 3.3 Análisis de localización génica

Para poder realizar un correcto análisis de localización génica es importante determinar primero si las proteínas estudiadas se corresponden con un único gen o si están codificadas por operones. Para ello, se realizó una búsqueda de las secuencias utilizadas en el análisis con el software Fgenesh (38) indicando que las proteínas TEM-12, SHV-5 y CTX-M-9 están codificadas por una única unidad transcripcional y, por lo tanto, no conforman operones.

Se ha realizado dicha búsqueda con el total de secuencias analizadas a lo largo del trabajo, sin embargo, como resultado y a modo de comprobación únicamente se muestra una de las secuencias buscadas para cada una de las proteínas de estudio. Los resultados de dichas comprobaciones se muestran en la **Figura 8** para la proteína TEM-12, en la **Figura 9** para la proteína SHhV-5 y, finalmente, en la **Figura 10** para la proteína CTX-M-9.

```
Prediction of potential genes in microbial genomes
Time: Tue Jan 1 00:00:00 2005
Seq name: NG_050163.1 Klebsiella oxytoca 0400-1 blaTEM gene for class A extended
Length of sequence - 1001 bp
Number of predicted genes - 1
Number of transcription units - 1, operons - 0
      N      Tu/Op  Conserved S          Start      End      Score
          pairs(N/Pv)
      1      1 Tu  1      .      +  CDS      101 -      961      409
Predicted protein(s):
>GENE      1      101 -      961      409      286 aa, chain +
MSIQHFRVALIPFFAAFCPLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP
EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL
CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAF LHNMGDHSVTRLDSEWPELNEAIPNDERDTTM
PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSAIPAGWFIADKSGAGERGS
RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW
```

**Figura 8.** Resultados obtenidos en la búsqueda de operones en la secuencia nucleotídica codificadora de la proteína TEM-12, a partir de la secuencia utilizada como patrón en el análisis filogenético (*Klebsiella oxytoca* 0400-1).

```

Prediction of potential genes in microbial genomes
Time: Tue Jan 1 00:00:00 2005
Seq name: NG_050087.1:1-969 Klebsiella pneumoniae blaSHV gene for class A extend
Length of sequence - 969 bp
Number of predicted genes - 1
Number of transcription units - 1, operons - 0
      N      Tu/Op  Conserved S          Start      End      Score
              pairs(N/Pv)
      1      1 Tu 1      .      +   CDS      47 -      961      394
Predicted protein(s):
>GENE      1      47 -      961      394      304 aa, chain +
LSLLYSPLSALTQGCIVVMRYIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIKLSESQLSGRVGM
IEMDLASGRTLAWRADERFPMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHRYQQDLVDYS
PVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWE
TELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQLLQWVDDRVAGPLIRSVLP
AGWFIADKTGASKRGARGIVALLGPNNKAERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIE
HWQR

```

**Figura 9.** Resultados obtenidos en la búsqueda de operones en la secuencia nucleotídica codificadora de la proteína SHV-5, a partir de la secuencia utilizada como patrón en el análisis filogenético (*Klebsiella pneumoniae*).

```

Prediction of potential genes in microbial genomes
Time: Tue Jan 1 00:00:00 2005
Seq name: CP052871.1:276812-277887 Enterobacter cloacae strain 3849 plasmid p384
Length of sequence - 1076 bp
Number of predicted genes - 1
Number of transcription units - 1, operons - 0
      N      Tu/Op  Conserved S          Start      End      Score
              pairs(N/Pv)
      1      1 Tu 1      .      +   CDS      125 -      976      458
Predicted protein(s):
>GENE      1      125 -      976      458      283 aa, chain +
MMFAAAACIPLLLGSAPLYAQTSAVQQKLAALKSSGGRLGVALIDTADNTQVLYRGDER
FPMCSTSKVMAAAAVLKQSETQKQLLNQPVVEIKPADLVNYPNPIAEKHVNGTMTLAELSAA
ALQYSDNTAMNKLIAQLGGPGGVTAFAARAIGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDPRDTTTPRA
MAQTLRQLTLGHALGETQRAQLVTWLKGNTTGAASIRAGLPTSWTAGDKTGSGDYGTND
IAVIWPQGRAPLVLVYFTQPQQNAESRRDVLASAARIIEGL

```

**Figura 10.** Resultados obtenidos en la búsqueda de operones en la secuencia nucleotídica codificadora de la proteína CTX-M-9, a partir de la secuencia utilizada como patrón en el análisis filogenético (*Enterobacter cloacae* 3849).



## 4. Discusión

### 4.1 Secuencias obtenidas

De manera general, se ha encontrado que las 3 proteínas de estudio (TEM-12, SHV-5 y CTX-M-9) están predominantemente codificadas en plásmidos. En el caso del gen TEM-12, este hecho concuerda con la bibliografía consultada. La información previa sobre este tipo de BLEE indica que suelen estar contenidos en plásmidos y asociados a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella* (29) (30). Esto se refleja totalmente en los resultados obtenidos, observados en la **Figura 2**. En el presente estudio podemos concluir que la mayoría de las cepas analizadas portan el gen TEM-12 en un plásmido, a excepción de algunas cepas de *E. coli* y *Klebsiella oxytoca*.

Los resultados obtenidos para el gen SHV-5 muestran resultados coincidentes con la bibliografía consultada. Ya que de manera general, igual que en el caso anterior, este tipo de BLEE suelen asociarse a plásmidos o elementos móviles (20). En el análisis llevado a cabo en este estudio se comprueba que la mayoría de las secuencias encontradas se corresponden con regiones de ADN codificadas en diferentes plásmidos. Únicamente se encuentran algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Shigella flexneri* que se localizan en regiones cromosómicas. Estos resultados, al igual que la evidencia previa sobre los mecanismos de transmisión génica de las BLEE (29), son una clara evidencia de la creciente aparición y propagación de este tipo de resistencias entre distintas cepas y especies bacterianas.

En cuanto al gen CTX-M-9, los resultados concuerdan con la bibliografía consultada, ya que en este caso se trata de proteínas codificadas por genes de historia evolutiva distinta, contenidas tanto en plásmidos como en cromosomas (32). Aunque la mayoría de las cepas analizadas se corresponden con plásmidos, aparecen muchas más con el gen contenido en ADN cromosómico que en los otros dos casos estudiados. Esta situación aparece en varias cepas de *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella* sp.

## 4.2 Árboles filogenéticos

En los tres casos, se observan patrones poco definidos de las relaciones evolutivas que pueda haber entre las distintas cepas estudiadas. De manera general, las agrupaciones originadas no se distribuyen en función del género o la especie. Este hecho junto con la elevada presencia de secuencias codificadas en plásmidos, que se ha observado en las **Figuras 2, 3 y 4**, ayudan a comprender un poco mejor la creciente aparición de bacterias resistentes a BLEE. Estos resultados son indicativos de que este tipo de genes están muy presentes en elementos móviles, tales como plásmidos o transposones (41). Este tipo de transferencia de plásmidos bacterianos es la forma más eficiente de propagación horizontal de genes, siendo considerada como una de las principales razones del aumento en el número de bacterias que exhiben resistencias múltiples a antibióticos (42).

De las tres filogenias realizadas, aparentemente el primer árbol (**Figura 2**) es el que presenta unos resultados más coherentes en cuanto a agrupación por género o especie microbiana. En los otros dos árboles generados (**Figuras 3 y 4**) estas relaciones son un poco más confusas. Sin embargo, en los tres casos queda patente que, de manera general, aquellas secuencias pertenecientes al mismo grupo taxonómico están más próximas evolutivamente entre ellas que en comparación con otros grupos. Este hecho resulta evidente y ha sido corroborado previamente por otros autores analizando los genes ARNr 16S y *gyrB* (43).

En cuanto a las secuencias codificadas en cromosomas, resulta evidente que sean más parecidas y estén evolutivamente más próximas aquellas que se corresponden con la misma especie o género bacteriano. Mientras que las secuencias localizadas en plásmidos, gracias a la transferencia horizontal, no tendrían por qué seguir este mismo patrón (44). Sin embargo, en los resultados se aprecia que siguen siendo más próximas aquellas que se corresponden con el mismo taxón. Esto puede deberse, a que como es lógico las cepas de la misma especie o género bacteriano, por lo general, van a compartir el mismo nicho y, por lo tanto, es más fácil que se produzca transferencia horizontal entre estos grupos que con otras bacterias.

### 4.3 Comparación de filogenias con el gen ARNr 16S

En los tres casos planteados existen claras diferencias de organización filogenética en función de si analizamos el árbol obtenido con la propia proteína de estudio o el gen del ARNr 16S. Aunque de manera general, los seis árboles filogenéticos agrupan las cepas bacterianas por géneros o especies, los obtenidos para el gen ARNr 16S muestran esta tendencia de forma más clara que los obtenidos con las proteínas estudiadas. Esto puede deberse a que, como es lógico, individuos de diferente especie estén más lejos evolutivamente en función de relaciones basadas en genes codificados en ADN cromosómico (45). Este hecho parece no cumplirse en los árboles correspondientes a las cepas obtenidas a partir de la proteína TEM-12, que parecen tener mejor ajuste a este hecho en el árbol realizado con la proteína de estudio en lugar de con el gen de ARNr 16S. Una solución factible para solucionar este problema sería utilizar el gen *gyrB* para realizar la comparación de filogenias, ya que otros autores han obtenido mejores ajustes en estudios previos (43).

Las diferencias entre filogenias observadas en las imágenes comparativas de los árboles (**Figuras 5, 6 y 7**) son un claro indicativo de la transferencia horizontal de estos genes de resistencia a antibióticos betalactámicos. Otro hecho que puede ser representativo de esta transmisión horizontal es que muchas de las cepas analizadas solo tienen secuenciado el genoma del plásmido en el que se codifican las proteínas de estudio (solo aparecen las secuencias de los plásmidos en las bases de datos). Es por este hecho, por lo que las figuras comparativas han tenido que ser simplificadas, presentando menos nodos que los árboles realizados originalmente. Las diferencias de filogenia entre los árboles obtenidos para las proteínas de estudio y el gen ARNr 16S indican que la transferencia horizontal de estos genes de resistencia a antibióticos se produce sobre todo entre cepas de la misma especie o género y entre aquellas bacterias, que aun siendo de diferente género, comparten nicho vital (45).

En la primera comparación se puede observar claramente que en función de la proteína TEM-12, las cepas más próximas entre si se corresponden con diferentes cepas de *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Shigella dysenteriae*. Este

hecho puede deberse a que, de manera general, las cepas de estos grupos bacterianos comparten nicho, siendo huéspedes en el intestino humano y asociándose con infecciones de origen alimentario. *E. coli* es un miembro importante de la microflora intestinal de los seres humanos y otros mamíferos, aunque en ocasiones puede llegar a ser patógena (46). Las cepas de *Salmonella* sí son patógenas para el ser humano y suelen transmitirse por la ingesta de alimentos o agua contaminados con heces infectadas (47). Además, *Shigella dysenteriae* también es una bacteria patógena, que puede transmitirse por la ingesta de alimentos o agua contaminados y/o por el contacto estrecho con una persona infectada (48).

En el caso de la comparación entre la filogenia obtenida con la proteína SHV-5 y el gen ARNr 16S, se comprueba claramente que están más próximas entre sí aquellas cepas correspondientes al mismo grupo taxonómico. Hecho que no ocurre en el árbol obtenido con la proteína de estudio. Además, a simple vista la distribución obtenida en dicho árbol tampoco parece estar asociado al tipo de infección producida, como sí ocurría en el caso de la proteína TEM-12. Sin embargo, la mayoría de las cepas presentes en dicho árbol se corresponden con el género *Klebsiella*, bacterias que suelen asociarse con infecciones de origen intrahospitalario (49). Otros géneros que aparecen repetidamente en dicha filogenia son *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Leclercia*, microorganismos que suelen encontrarse en infecciones polimicrobianas y de origen nosocomial (50) (51) (52). Por lo tanto, es muy posible que las relaciones evolutivas encontradas para dicha proteína estén debidas a la transferencia horizontal de estos genes de resistencia, produciéndose entre cepas presentes en infecciones polimicrobianas o de origen nosocomial.

Finalmente, la comparación realizada entre la proteína CTX-M-9 y el gen del ARNr 16S también muestra diferencias evidentes, agrupando de forma más precisa por grupo microbiano en el caso del ARNr 16S. Sin embargo, el árbol obtenido para la proteína CTX-M-9 agrupa por un lado la mayoría de las cepas correspondientes con *Klebsiella*, *Leclercia* y *Citrobacter*, que al igual que en el caso anterior suelen asociarse con infecciones de origen intrahospitalario y que, por lo tanto, pueden compartir el mismo nicho. Por otro lado, se agrupan

cepas pertenecientes al género *Enterobacter* y *E. coli*, que también pueden asociarse a infecciones de origen nosocomial (53) o simplemente corresponderse con la flora intestinal normal del cuerpo humano (46). Este hecho también hace que sean bacterias propensas a compartir nicho y, por lo tanto, a que se produzca transferencia horizontal de plásmidos entre ellas.

#### **4.4 Análisis de localización génica**

Los resultados obtenidos en este apartado indican que las tres proteínas analizadas en el presente estudio están codificadas por una única unidad transcripcional, correspondiente a un gen y no a un operón. Es muy frecuente que las proteínas encargadas de conferir resistencia frente a antibióticos estén codificadas por operones en plásmidos (54) (55). Por este motivo, resultaba importante hacer la comprobación de si los genes de estudio formaban parte de un operón o si por el contrario se trataba de un único gen. De manera que si se hubiera tratado de un operón se hubiera podido realizar el pertinente análisis de localización génica, comprobando la distribución de dichos genes en función de las distintas cepas estudiadas.

## **5. Conclusiones**

Con el desarrollo del presente Trabajo Fin de Máster se ha realizado una descripción sobre el incremento en la aparición de enterobacterias resistentes a antibióticos betalactámicos, incidiendo en los métodos de transmisión de dichas resistencias entre cepas de diferentes grupos taxonómicos. Al término del trabajo se han conseguido identificar las principales enterobacterias productoras de BLEE y seleccionar varios genes trascendentales en la producción de dichas enzimas. Además, se ha podido estudiar y comparar estos genes implicados en la producción de BLEE en función de las cepas bacterianas en las que aparecen.

La mayoría de las secuencias relacionadas con la producción de BLEE se encuentran localizadas en plásmidos, en lugar de en ADN cromosómico, siendo un claro indicativo de la transferencia horizontal de este tipo de genes. Por otro lado, las comparaciones realizadas a partir de las secuencias parecen

confirmar claramente este proceso de transferencia de genes de resistencia, codificados en una única unidad transcripcional, a través de plásmidos. Además, las comparaciones entre las filogenias de las enzimas de estudio y el gen ARNr 16S son un claro indicativo de que, en muchos casos, esta transferencia de genes de resistencia se produce entre bacterias que comparten nicho, o lo que es lo mismo, están presentes en el mismo tipo de infección.

### **5.1 Análisis crítico del trabajo**

Finalmente, en cuanto al análisis crítico del presente trabajo, cabe destacar que con su realización se ha conseguido llevar a cabo todos los objetivos planteados en un principio, así como todas las tareas asignadas a cada uno de ellos. Generalmente, se ha tratado de seguir fielmente la planificación establecida al inicio del estudio. Sin embargo, ha sido imposible no realizar ligeras modificaciones a medida que avanzaba el proyecto, debido a pequeños problemas y dudas que se han planteado a lo largo de todo el trabajo.

En cuanto a líneas de trabajo futuro sería interesante realizar una selección diferente de proteínas implicadas en la resistencia a antibióticos betalactámicos, teniendo en cuenta su codificación en operones, para poder realizar un correcto análisis de localización génica y analizar diferencias entre disposición de sus genes en función de la cepa analizada. Otra opción de investigación futura muy interesante sería ampliar el rango de estudio fuera de las enterobacterias. Ya que, aunque son los microorganismos mayormente productores de este tipo de enzimas, existen otros géneros potencialmente patógenos (no incluidos dentro de las enterobacterias) que están empezando a desarrollar este tipo de resistencias a antibióticos. Finalmente, también podría ser interesante realizar este tipo de comparaciones con otros tipos de resistencia a antibióticos, quizás menos comunes, pero si con gran importancia en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias con resistencias múltiples.

## 6. Glosario

- **Enterobacterias:** Familia de bacterias Gram negativas del orden Enterobacterales, que contiene más de 30 géneros con morfologías diferentes (cocos o bacilos) y forman parte del microbiota intestinal.
- **$\beta$ -lactámicos:** Cualquier compuesto antibiótico con un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura molecular, incluyendo derivados de la penicilina, cefalosporinas, monobactámicos, carbacefem, carbapenems...
- **Bacterias multirresistentes:** Bacterias que han adquirido o generado resistencia a más de 2 de los antibióticos más usados en tratamientos en clínica humana o veterinaria.
- **Betalactamasas:** Enzimas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por genes cromosómicos o transferidos por plásmidos y cuyo mecanismo de acción implica la resistencia bacteriana frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos.
- **BLEE:** Betalactamasas de espectro extendido, betalactamasas que actúan frente antibióticos betalactámicos de segunda y tercera generación.
- **ARNr 16S:** ARN ribosomal 16S; es la subunidad pequeña de los ribosomas procariontes. El gen que la codifica es utilizado para la construcción de filogenias debido a su baja tasa de evolución.
- **BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool. Herramienta de búsqueda y selección de secuencias.
- **FASTA:** Se trata de un formato de fichero informático basado en texto. Se utiliza para representar secuencias de ácidos nucleicos o péptidos. Se caracteriza porque los pares de bases o los aminoácidos se escriben utilizando códigos de una letra.
- **APE:** Analyses of Phylogenetics and Evolution; Paquete de funciones de R utilizado, en este caso, para construir y comparar árboles filogenéticos.

## 7. Bibliografía

1. Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*. 2010;118(1):1-36.
2. D'Costa V, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477:457-61.
3. Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th Century. *Jama*. 1999;281(1):61-6.
4. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(2):116-29.
5. Capita R, Alonso-Calleja C. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;5(1):11-48.
6. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(1):44-52.
7. Bayles KW. The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol*. 2000;8:274-8.
8. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Gobierno de España; 2018.
9. European Academies Science Advisory Council. Tackling antibacterial resistance in Europe. London: The Royal Society; 2007.
10. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Ginebra (Suiza): WHO Press; 2014.
11. European Parliament. Antibiotic Resistance. IP/A/STOA/. Bruselas: Policy Department Economy and Science; 2006.



12. Ausubel JH, Meyer PS, Wernick IK. Death and the human environment: the United States in the 20th century. *Technol Soc.* 2001;23(3):131-46.
13. Levy SB, Fitzgerald GB, Macone AB. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature.* 1976;260:40-2.
14. Aguirre L, Vidal A, Seminati C, Tello M, Redondo N, Darwich L, et al. Antimicrobial resistance profile and prevalence of extended-spectrum betalactamases (ESBL), AmpC beta-lactamases and colistin resistance (mcr) genes in *Escherichia coli* from swine between 1999 and 2018. *Porc Heal Manag.* 2020;6(8):1-6.
15. Falodun OI, Musa IB. *Pseudomonas* species from cattle dung producing extended spectrum and metallo beta-lactamases. *Eur J Biol Res.* 2020;10(1):1-10.
16. Perozo Mena AJ, Castellano Gonzalez MJ. Extended spectrum betalactamase detection in *Enterobacteriaceae* family strains. *Kasmera.* 2009;37(1):25-37.
17. Seral C, Gude MJ, Castillo FJ. Emergencia de  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Española Quimioter.* 2012;25(2):89-99.
18. Whashington JA. Functions and activities of the Area Committee on Microbiology of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4(2):150-5.
19. Seral García C, de la Gándara MP, García FJC. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:12-8.
20. Bali EB, Açıık L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *African J Microbiol Res.* 2010;4(8):650-4.

21. Subramanya SH, Bairy I, Nayak N, Amberpet R, Padukone S, Metok Y, et al. Detection and characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from the gut of healthy chickens, *Gallus gallus domesticus* in rural Nepal: Dominance of CTX-M-15-non-ST131 *Escherichia coli* clones. PLoS One. 2020;15(5):e0227725.
22. Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res. 2012;8(21):1-9.
23. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). J Antimicrob Chemother. 2006;58(1):211-5.
24. Egervärn M, Börjesson S, Byfors S, Finn M, Kaipe C, Englund S, et al. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and Salmonella on meat imported into Sweden. Int J Food Microbiol. 2014;171:8-14.
25. Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21(2):77-82.
26. Rottier WC, Ammerlaan HS, Bonten MJ. Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and patient outcome: a meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2012;67(6):1311-20.
27. González MA. Resistencia epigenética de las bacterias a los antibióticos: Parte 1. Conogasi Conocimiento para la Vida. 2018 [citado 21 de octubre de 2020]. Disponible en: <http://conogasi.org/articulos/resistencia-epigenetica-de-las-bacterias-a-los-antibioticos-parte-1/>

28. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1211-33.
29. Morejón García M. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *Rev Cubana Med.* 2013;52(4):272-80.
30. Sharma J, Sharma M, Ray P. Detection of TEM & SHV genes in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. *Indian J Med Res.* 2010;132(3):332-7.
31. Fu Y, Zhang F, Zhang W, Chen X, Zhao Y, Ma J, et al. Differential expression of blaSHV related to susceptibility to ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29(3):344-7.
32. Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, et al. A Novel CTX-M  $\beta$ -Lactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(7):1936-42.
33. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-10. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
34. National Center for Biotechnology Information (NCBI): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 1988. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
35. Kumar S, Stecher G, Li M, Niyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35:1547-9.
36. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406-25.
37. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution.
38. Fgenesh [citado 4 de enero de 2021]. Disponible en: <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=gfindb>

39. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* (N Y). 1985;39:783-91.
40. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:11030-5.
41. Benz F, Huisman JS, Bakkeren E, Herter JA, Stadler T, Ackermann M, et al. Plasmid- and strain-specific factors drive variation in ESBL-plasmid spread in vitro and in vivo. *ISME J*. 2020; <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00819-4>.
42. Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(2):277-301.
43. Dauga C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52(2):531-47.
44. Kurland CG, Canback B, Berg OG. Horizontal gene transfer: A critical view. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(17):9658-62.
45. Ludwig W, Schleifer KH. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev*. 1994;15(2-3):155-73.
46. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):123-40.
47. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, et al. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect*. 2000;125(2):229-55.
48. Niyogi SK. Shigellosis. *J Microbiol*. 2005;43(2):133-43.
49. Selden R, Lee S, Wang WLL, Bennett J V., Eickhoff TC. Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. *Ann Intern Med*. 1971;74(5):657-64.
50. Hess B, Burchett A, Huntington MK. *Leclercia adecarboxylata* in an immunocompetent patient. *J Med Microbiol*. 2008;57(7):896-8.

51. Doran TI. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children. Clin Infect Dis. 1999;28(2):384-94.
52. Gaston MA. *Enterobacter*: an emerging nosocomial pathogen. J Hosp Infect. 1988;11(3):197-208.
53. Davin-Regli A. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Front Microbiol. 2015;6:392.
54. Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat SHADI. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. J Bacteriol. 1993;175(22):1363-7372.
55. Obeed NJ, Dhahi MAR. The Role of Mutation and Gene Expression Level of marRAB operon in Multi Antibiotic Resistance uropathic *Escherichia coli* and O157: H7 isolates from patients in Baghdad. J Pharm Sci Res. 2020;12(3):365-74.

## 8. Anexos

### 8.1 Anexo I: Secuencias nucleotídicas de las proteínas de estudio

A continuación, se detallan las secuencias de nucleótidos (en formato FASTA) utilizadas como patrón para realizar la búsqueda de secuencias homólogas de cada una de las tres BLEE analizadas en el presente estudio:

#### TEM-12

```
>NG_050163.1 Klebsiella oxytoca 0400-1 blaTEM gene for class A
extended-spectrum beta-lactamase TEM-12, complete CDS
AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGATACAATAACCCTGATAA
ATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAAGATATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTT
TTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC
GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACG
CCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAC
AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCAGTGCATAACCATGAGTGATAAC
ACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG
GGGATCATGTAACCCGCCCTTGATAGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGA
CACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT
TCCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTC
CGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGATCTCGCGGTATCATTGCAGCACT
GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACG
GACTGTTGCAAAGTTAGCGAT
```

#### SHV-5

```
>NG_050087.1 Klebsiella pneumoniae blaSHV gene for class A extended-
spectrum beta-lactamase SHV-5, complete CDS
GAAAAAAGAGGAATTGTGAATCAGCAAAACGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGCTTCTTTACTCGCCTTTA
TCGGCCCTCACTCAAGGATGTATTGTGGTTATGCGTTATATTTCGCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCA
CCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACCTAAGCGAAAGCCAGCTGTC
GGCCCGGTAGGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGACGCTGACCGCTGGCGCGCCGATGAA
CGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTG
ACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAA
ACACCTTGCCGACGGCATGACGGTCCGGCGAACTCTGCGCCCGCCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCC
GCCAATCTGCTACTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGGCACA
ACGTCACCCGCTTGACCGCTGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGGCGACGCCCGCGACACCAC
TACCCCGGCCAGCATGGCCGCGACCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTGCGAA
CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGG
GCTGGTTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTAGCAAGCGGGTGCAGCGGGATTGTCGCCCTGCTTGGCCC
GAATAACAAAAGCAGAGCGCATTTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACCCCGCGAGCATGGCCGAGCGAAAT
CAGCAAATCGCCGGATCGGCGCGGCGTGTGAGCACTGGCAACGCTAACCCGGCGT
```

## CTX-M-9

>NG\_049043.1 Escherichia coli 785-D pMSP071 blaCTX-M gene for class A extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-9, complete CDS

```
ATACCCGAGGCGCGACAGAAAAATCGCGGCGTTTTGCTTTTTTCAGTTCGACCTTTTAATGAATACTGATGT
AACACGGATTGACCGTATTGGGAGTTTGAGATGGTGACAAAGAGAGTGCAACGGATGATGTTTCGCGGCGG
CGGCGTGCATTCCGCTGCTGCTGGGCAGCGCGCCGCTTTATGCGCAGACGAGTGGCGTGCAGCAAAAGCT
GGCGGCGCTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGGCTGGGCGTCGCGCTCATCGATAACCGCAGATAATACGCAG
GTGCTTTTATCGCGGTGATGAACGCTTTCCAATGTGCAGTACCAGTAAAGTTATGGCGGCCGCGGCGGTGC
TTAAGCAGAGTGAAACGCAAAAGCAGCTGCTTAATCAGCCTGTCGAGATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAA
CTACAATCCGATTGCCGAAAAACACGTCAACGGCACAATGACGCTGGCAGAGCTGAGCGCGGCCGCGTTG
CAGTACAGCGACAATACCGCCATGAACAAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCCGGGAGGCGTGACGGCTT
TTGCCCGCGCGATCGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAATACCGCCATTCC
CGGCGACCCGAGAGACACCACCACGCCGCGGGCGATGGCACAGACGTTGCGTCAGCTTACGCTGGGTCAT
GCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGGCTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCA
TTCGGGCGCGCTTACCGACGTCGTGGACTGCAGGTGATAAGACCGGCAGCGCGACTACGGCACCACCAA
TGATATTGCGGTGATCTGGCCGCAGGGTCTGCGCCGCTGGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAA
CAGAACGCAGAGAGCCCGCGATGTGCTGGCTTCAGCGGCGAGAATCATCGCCGAAGGGCTGTAACCTCT
CAATAATGGGGCGCTACGGTGCCCCACTTTCTATTTATATATCCGTAAAAGCTTTTCTTGATATACATCT
TCAGCTTTTTGTATGATTATTAATAT
```

## 8.2 Anexo II: Árboles filogenéticos junto con distancias evolutivas

### TEM-12 completo

```
((((((((Klebsiella oxytoca tnpR gene 3 end and blaT-12: 0.00000000,
Klebsiella oxytoca 0400-1 blaTEM-12: 0.00000000): 0.00051570,
((((((((Klebsiella pneumoniae strain KP1766 plasmid KP1766 pl:
0.00000000, Klebsiella pneumoniae strain NR5632 plasmid NR5632 pl:
0.00000000): 0.00000000, Klebsiella pneumoniae strain KP1768 plasmid
KP1768 pl: 0.00000000): 0.00000000, Klebsiella pneumoniae strain
FDAARGOS 447 plasmid unnamed1: 0.00000000): 0.00000000, Klebsiella
pneumoniae strain AR 0120 plasmid tig00000516: 0.00000000):
0.00000000, Escherichia coli strain 2009C-3133: 0.00000000):
0.00000362, (Escherichia coli TEM-84: 0.00000000, Escherichia coli
blaTEM TEM-84: 0.00000000): 0.00101869): 0.00001440, 'Escherichia coli
TEM1F (blaTEM1F)': 0.00000000): 0.00047695): 0.00055143, (Escherichia
coli strain EC3587 plasmid pEC3587: 0.00099675, Escherichia coli
TUM1137 blaTEM TEM-7: 0.00104910): 0.00079654): 0.00031093,
Escherichia coli strain RHB34-C05 chromosome: 0.00000000): 0.00012623,
Shigella dysenteriae 1 strain BU53M1 plasmid pBU53M1: 0.00000000):
0.00023143, Shigella dysenteriae 1 strain A5468 plasmid pA5468:
0.00000000): 0.00042725, Shigella dysenteriae strain BU53M1 plasmid
unnamed1: 0.00000000): 0.00075930, Escherichia coli strain AR 0369
plasmid unnamed3: 0.00000000, (Escherichia coli strain RHB34-C05
plasmid pRHB34-C05 2: 0.00000000, (Escherichia coli strain K-12
plasmid IP40a: 0.00000000, (Escherichia coli strain 1190 plasmid p86:
0.00000000, (Escherichia coli strain Ec20-Lar plasmid unnamed:
0.00000000, (Escherichia coli strain BM21 plasmid pIP69: 0.00000000,
(Escherichia coli strain Ecol 316 plasmid pEC316 KPC: 0.00629298,
Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Paratyphi_B strain R69
plasmid R69: 0.00000000): 0.00328951): 0.00365401): 0.00138177):
0.00072725): 0.00038382): 0.75258474);
```

## TEM-12 reducido para la comparación

(((((K. pneumoniae KP1766: 0.00000000, K. pneumoniae NR5632: 0.00000000): 0.00000000, K. pneumoniae KP1768: 0.00000000): 0.00000000, K. pneumoniae FDAARGOS\_447: 0.00000000): 0.00000000, K. pneumoniae AR\_0120: 0.00000000): 0.00000000, E. coli 2009C-3133: 0.00000000): 0.00026788, K.oxytoca: 0.00073162): 0.00219378, Shigella dysenteriae: 0.00000000): 0.00135979, E. coli AR\_0369: 0.00000000, (E. coli RHB34-C05: 0.00000000, (E. coli K-12: 0.00000000, (E. coli 1190: 0.00000000, (E. coli 316: 0.00399987, Salmonella enterica: 0.00000000): 0.00401064): 0.00164377): 0.00091320): 0.86041427);

## ARNr 16S con las cepas del árbol anterior

(((((K. pneumoniae FDAARGOS\_447: 0.00070080, K. pneumoniae NR5632: 0.00138578): 0.00097377, K. pneumoniae AR\_0120: 0.00391969): 0.00708487, K. oxytoca: 0.01014030): 0.00513536, Salmonella enterica: 0.01259400): 0.01457961, E. coli 2009C-3133: 0.00148042): 0.00026731, E. coli 316: 0.00000000): 0.00124656, E. coli 1190: 0.00000000): 0.00187412, Shigella dysenteriae: 0.00500737, (E. coli K-12: 0.00000000, (E. coli RHB34-C05: 0.00072531, (E. coli AR0369: 0.00048803, (K. pneumoniae KP1766: 0.00200020, K. pneumoniae KP1768: 0.00359201): 0.02891550): 0.00121633): 0.00155240): 0.70478359);

## SHV-5 completo

((((((((((((((Klebsiella pneumoniae strain AR 0047 plasmid tig00000002: 0.00309129, Klebsiella pneumoniae strain KPNORMBLD 2014 104014 plasmid unnamed1: 0.00000000): 0.00166454, 'Escherichia coli strain 711 plasmid: RCS25 p': 0.00000000): 0.00090163, Citrobacter freundii complex sp. CFNIH9 plasmid pCFR-eb27: 0.00000000): 0.00049180, Citrobacter freundii strain ACM130 plasmid pACM130: 0.00000000): 0.00022540, Klebsiella oxytoca strain ATCC 51983 plasmid pACM1: 0.00000000): 0.00013524, Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae KPNIH27 plasmid pKEC-dc3: 0.00000000): 0.00008452, Citrobacter freundii CFNIH1 plasmid pKEC-a3c: 0.00000000): 0.00005635, Escherichia coli plasmid p1658/97: 0.00000000): 0.00004226, Enterobacter cloacae plasmid HNM1: 0.00000000): 0.00004226, Salmonella entérica serovar Typhimurium plasmid pSEM: 0.00000000): 0.00019645, (Klebsiella pneumoniae strain NK245 plasmid pK245: 0.00000000, (Klebsiella michiganensis strain M82255 plasmid pKOCBH-C: 0.00000000, (Klebsiella michiganensis strain FDAARGOS 647 plasmid unnamed2: 0.00000000, Klebsiella sp. Strain TR5 plasmid pYK5: 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00049347): 0.00074936, Enterobacter hormaechei subsp. Xiangfangensis strain Ec61 plasmid pEc61B: 0.00000000, ((Klebsiella ozaenae plasmid pBP60-1-2 SHV-2: 0.00000000, Shigella flexneri RecF SHV-2: 0.00000000): 0.00030920, (Klebsiella pneumoniae blaSHV-5: 0.00000000, (Klebsiella pneumoniae RecF: 0.00000000, (Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium strain 202 plasmid pSEM: 0.00000000, (Escherichia coli strain CZD1527 plasmid pIGT15: 0.00000000, (Enterobacter cloacae strain colR/S: 0.00000000, (Klebsiella pneumoniae strain AR 0117 plasmid unitig 1: 0.00000000, (Leclercia sp. LSNIH1 plasmid pLEC-1cb1: 0.00000000, (Leclercia sp. LSNIH3 plasmid pLEC-7c0d: 0.00000000, (Klebsiella michiganensis strain AR375 plasmid unnamed2: 0.00000000, (Escherichia coli strain S15FP06257 plasmid unnamed: 0.00000000, Klebsiella pneumoniae shv5 gene for SHV-5 beta-lactamase: 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00072513): 108.83455471);



## SHV-5 reducido para la comparación

```
(((((K. pneumoniae AR0047 :0.00453617, K. pneumoniae NORM:
0.00000000): 0.00252010, Citrobacter freundii: 0.00000000):
0.00141755, K. oxytoca: 0.00000000): 0.00081003, K. pneumoniae
KPNIH27: 0.00000000): 0.00047252, Citrobacter freundii CFNIH1:
0.00000000): 0.00028351, Enterobacter cloacae: 0.00000000):
0.00017719, Salmonella enterica: 0.00000000): 0.00045591, (K.
michiganensis M82255: 0.00000000, (K. michiganensis FDAARGOS_647:
0.00000000, Klebsiella sp. TR5: 0.00000000): 0.00000000): 0.00057817):
0.00076996, Enterobacter hormaechei: 0.00000000, (Leclercia sp.
LSNIH3: 0.00000000, ((K. ozaenae: 0.00000000, Shigella flexneri:
0.00000000): 0.00026606, (K. pneumoniae: 0.00000000, (Enterobacter
cloacae colR/S: 0.00000000, (K. pneumoniae AR0117: 0.00000000,
(Leclercia sp. LSNIH1: 0.00000000, K. michiganensis AR375:
0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00076818):
0.35974238): 114.11026654);
```

## ARNr 16S con las cepas del árbol anterior

```
(((((K. pneumoniae: 0.00042537, K. pneumoniae KPNIH27:
0.00088267): 0.00034669, K. pneumoniae AR 0047: 0.00161604):
0.00225302, K. pneumoniae NORM: 0.00090762): 0.00036291, Klebsiella
sp. TR5: 0.00037040): 0.00132000, Klebsiella ozaenae: 0.00049688):
0.00846670, Salmonella enterica: 0.01325679): 0.00082504, (K. oxytoca:
0.00643054, (Citrobacter freundii: 0.00596314, Leclercia sp. LSNIH3:
0.00520135): 0.00058786): 0.00357982): 0.00545317, Enterobacter
hormaechei: 0.00257390): 0.03932527, Shigella flexneri: 0.00000000,
(Leclercia sp. LSNIH1: 0.00881802, ((Enterobacter cloacae: 0.00584931,
Enterobacter cloacae colR/S: 0.00071496): 0.00265380, (K. pneumoniae
AR0117: 0.01203735, (Citrobacter freundii CFNIH1: 0.00881265, (K.
michiganensis M82255: 0.00638879, (K. michiganensis FDAARGOS_647:
0.00083265, K. michiganensis AR375: 0.00112755): 0.00150014):
0.00276606): 0.00124357): 0.00229890): 0.00102046): 0.69175625);
```

## CTX-M-9 completo

```
(((((Escherichia coli plasmid pyc110.1 CTX-M-14:
0.00102602, Enterobacter aerogenes strain En45 CTX-M-9: 0.00000000):
0.00000122, Escherichia coli blaCTX-M-9: 0.00000000): 0.00000405,
Enterobacter cloacae strain 3849 plasmid p3846 IncHI2 mcr:
0.00000000): 0.00000480, Escherichia coli intI1 blaCTX-M-9:
0.00000000): 0.00000721, Escherichia coli plasmid pMSP071:
0.00000000): 0.00001153, Enterobacter cloacae plasmid pQC:
0.00000000): 0.00001922, Enterobacter cloacae plasmid pWP5-S18-ESBL-
01: 0.00000000): 0.00003294, Enterobacter hormaechei STN0717-64
plasmid pSTN0717-64-1: 0.00000000): 0.00005765, Escherichia coli 785-D
pMSP071: 0.00000000): 0.00010249, Escherichia coli strain 666 plasmid
RCS51 p: 0.00000000): 0.00018448, Escherichia coli strain 511 plasmid
RCS54 p: 0.00000000): 0.00033542, Enterobacter hormaechei strain
WCHEH020038 plasmid pCTXM9: 0.00000000): 0.00061493, Enterobacter
hormaechei subsp. Steigerwaltii strain ME-1 plasmid pME-1a:
0.00000000): 0.00113525, Citrobacter freundii strain 680 plasmid p680:
0.00000000): 0.00210833, Klebsiella pneumoniae strain C17KP0039
plasmid pC17KP0039-1: 0.00000000): 0.00398453, Escherichia coli
isolate JIE059 CTX-M-9: 0.00000000): 0.00810006, Klebsiella pneumoniae
strain L491 plasmid pKPC-L491: 0.00000000): 0.01382883, Escherichia
coli strain SCEC020022 plasmid pCTXM14_020022: 0.00000000):
0.02904781, Enterobacter cloacae strain NF901264 CTX-M-9: 0.00000000):
0.37776540, Escherichia coli strain K-340_blaCTX-M-9: 0.00000000):
```

3.23956908, *Escherichia coli* strain J93 plasmid pJ93M14b CTX-M-14: 0.00000000): 6.33887980, *Escherichia coli* plasmid pRYC110 blaCTX-M-9: 0.00000000): 270.19822137, (((*Klebsiella* sp. WP7-S18-CRE-03: 0.00000000, *Klebsiella* sp. WP7-S18-ESBL-04: 0.00000000): 0.00000000, *Klebsiella* sp. WP7-S18-CRE-02: 0.00000000): 194.82747426, (*Leclercia adecarboxylata* strain P12375 plasmid pP12375-1FII: 0.00000000, (*Raoultella planticola* strain KpNDM1 plasmid pKpNDM1: 0.00000000, (*Enterobacter cloacae* strain MRSN17626 plasmid pMRVIM0813: 0.00000000, (*Raoultella ornithinolytica* B1645-1 plasmid pCYNDM01: 0.00000000, (*Leclercia adecarboxylata* strain 16005813 plasmid p16005813C: 0.00000000, (*Citrobacter freundii* strain 154 plasmid p154: 0.00000000, (*Citrobacter freundii* strain 565 plasmid p565: 0.00000000, (*Escherichia coli* strain DSM 103246: 0.00000000, (*Klebsiella pneumoniae* isolate 98fb0f42-b809-11e8-aae5-3c4a9275d6c8: 0.00000000, (*Klebsiella* sp. WP4-W18-ESBL-05: 0.00000000, (*Escherichia coli* strain RHB35-C01 plasmid pRHB35-C01: 0.00000000, (*Klebsiella pneumoniae* strain Kp002 plasmid pJEG011: 0.00000000, (*Klebsiella pneumoniae* strain Kp Goe 33208 plasmid pKp Goe 208-2: 0.00000000, (*Klebsiella pneumoniae* strain DT1 plasmid pDT1: 0.00000000, ('*Escherichia coli* strain 676 plasmid: RCS60 p': 0.00000000, *Escherichia coli* strain 28Eco12 chromosome: 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 0.00000000): 5.49137356): 7.67007601): 3.95489551): 2.04676749): 1.05713280): 0.54679283): 0.28316057): 0.14682400): 0.07623554): 0.03964248): 444.91419958): 102.58101169, (*Escherichia coli* plasmid pOZ173: 469.56258606, *Enterobacter hormaechei* MH17-539M plasmid pMH17-539M-mcr9: 207.07480484): 208.15768603);

### CTX-M-9 reducido para la comparación

(((((Klebsiella sp. WP7-S18-CRE-02: 0.00000000, *Klebsiella* sp. WP7-S18-CRE-03: 0.00000000): 0.00000000, *Klebsiella* sp. WP7-S18-ESBL-04: 0.00000000): 0.00075879, *E. cloacae* 3849: 0.00000000): 0.00075879, *E. cloacae*: 0.00000000): 0.00113819, *E. hormaechei* STN0717-64: 0.00000000): 0.00182110, *E. hormaechei* WCHEH020038: 0.00000000): 0.00303516, *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*: 0.00000000): 0.00520314, *Citrobacter freundii* 680: 0.00000000): 0.00910549, *K. pneumoniae* C17KP0039: 0.00000000): 0.01677133, *K. pneumoniae* L491: 0.00000000): 0.02878939, *E. coli* SCEC020022: 0.00000000): 0.94381298, *E. aerogenes*: 0.00000000, (*E. coli* RHB35-C01: 0.00000000, (*K. pneumoniae* Goe33208: 0.00000000, (*E. coli* 28Eco12: 0.00000000, (*E. hormaechei*: 0.00000000, (*E. coli* DSM 103246: 0.00000000, (*K. pneumoniae*: 0.00000000, (*Leclercia adecarboxylata* P12375: 0.00000000, (*Raoultella planticola*: 0.00000000, (*Raoultella ornithinolytica*: 0.00000000, (*Leclercia adecarboxylata* 16005813: 0.00000000, (*Citrobacter freundii* 154: 0.00000000, (*Klebsiella* sp. WP4-W18-ESBL-05: 0.20118707, *Citrobacter freundii* 565: 0.00000000): 0.10496717): 0.05486920): 0.02874101): 0.01508903): 0.00794159): 0.00473753): 0.00201565): 0.76319472): 0.43651828): 0.23370356): 0.12584038): 107.96110042);

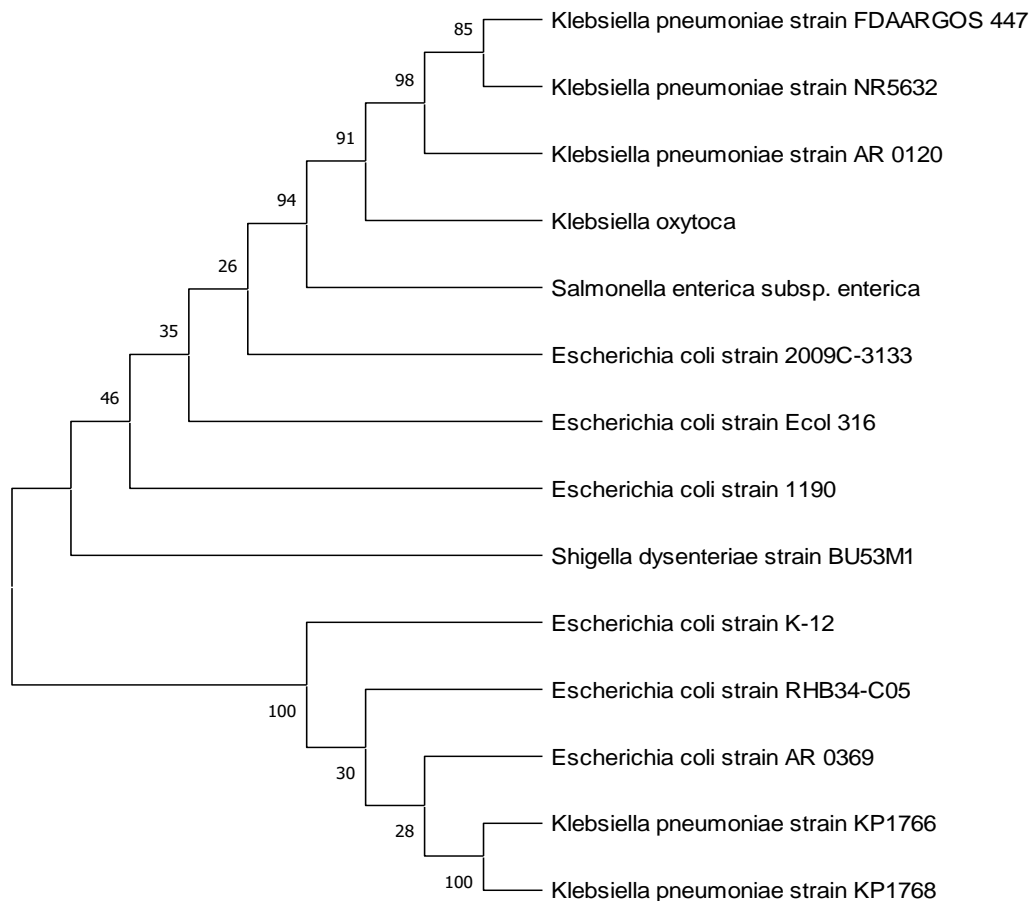
### ARNr 16S con las cepas del árbol anterior

(((((Klebsiella sp. WP4-W18-ESBL-05: 0.00713814, *Raoultella ornithinolytica*: 0.00402734): 0.00282761, *E. aerogenes* KCTC2190: 0.00244309): 0.00313328, (*Citrobacter freundii* 154: 0.00000000, (*Citrobacter freundii* 565: 0.00000000, (*Citrobacter freundii* 680: 0.00000000): 0.00000000): 0.00477279): 0.00303092, (*K. pneumoniae*: 0.00000000, (*K. pneumoniae* Goe33208: 0.00077603, (*K. pneumoniae* L491: 0.00000000, *K. pneumoniae* C17KP0039: 0.00000000): 0.00053071): 0.00269051): 0.00885208): 0.00406193, ((*E. cloacae* 3849: 0.00208685, *E. hormaechei* STN0717-64: 0.00000000): 0.00264517, (*E. hormaechei* NCTC

9394: 0.00003479, *E. hormaechei* WCHEH020038: 0.00061772): 0.00096018): 0.00447248): 0.00091645, *E. coli* DSM 103246: 0.01309552, ((*E. coli* 28Eco12: 0.00000000, *E. coli* SCEC020022: 0.00000000): 0.00028090, *E. coli* RHB35-C01: 0.00561114): 0.01124846, (*E. hormaechei* subsp. steigerwaltii: 0.00660173, ((*Klebsiella* sp. WP7-S18-CRE-03: 0.00000000, *Klebsiella* sp. WP7-S18-ESBL-04: 0.00000000): 0.00000000, *Klebsiella* sp. WP7-S18-CRE-02: 0.00000000): 0.01276877, (*Raoultella* planticola: 0.00291494, (*E. cloacae* GGT036: 0.00317269, (*Leclercia* adecarboxylata P12375: 0.00300106, *Leclercia* adecarboxylata 16005813: 0.00027243): 0.00406786): 0.00672464): 0.00125050): 0.00510250): 0.00265272): 0.70864994);

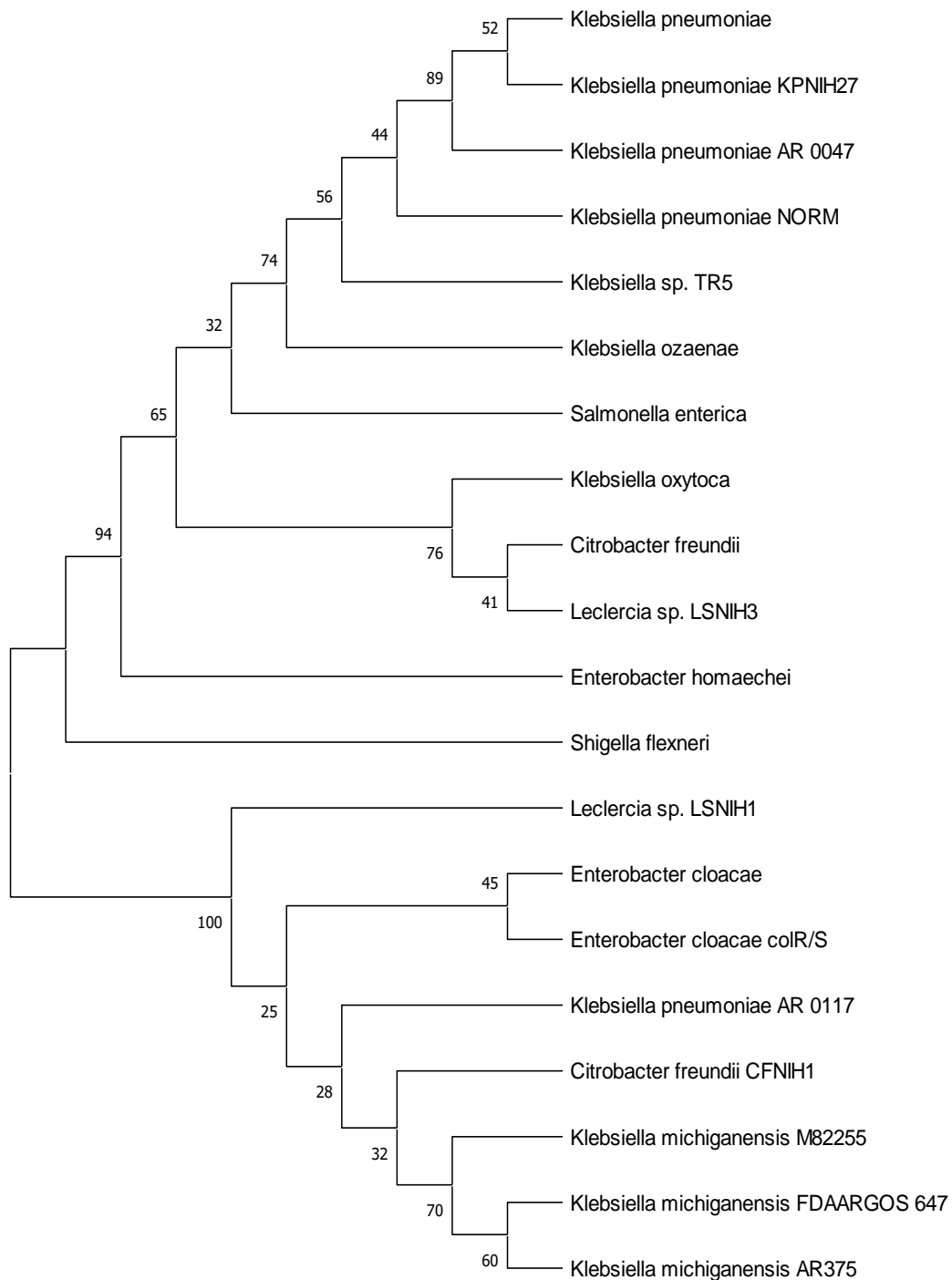
### 8.3 Anexo III: Representación gráfica de los árboles filogenéticos realizados con el gen ARNr 16S

ARNr 16S con las cepas obtenidas para la proteína TEM-12



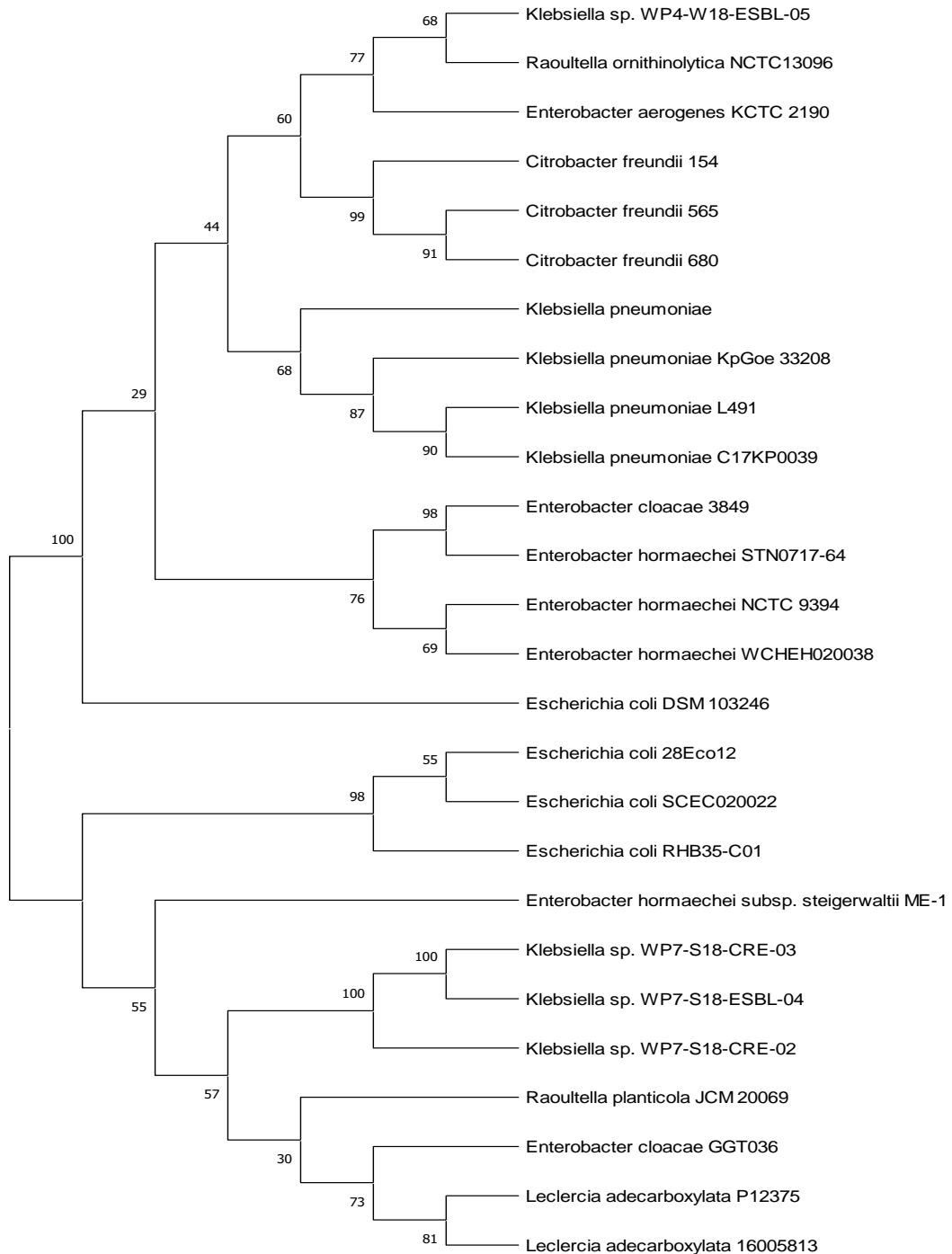
**Figura 11.** Relaciones evolutivas entre taxones de enterobacterias basadas en el gen ARNr 16S (a partir de las cepas obtenidas para la proteína TEM-12) inferidas mediante el método de Neighbor-Joining (36). El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (39). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Maximum Composite Likelihood (40). Este análisis involucró a 14 secuencias de nucleótidos y todas las posiciones ambiguas fueron eliminadas para cada par de secuencias. El dataset final contiene 1682 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo con el Software MEGA X (35).

## ARNr 16S con las cepas obtenidas para la proteína SHV-5



**Figura 12.** Relaciones evolutivas entre taxones de enterobacterias basadas en el gen ARNr 16S (a partir de las cepas obtenidas para la proteína SHV-5) inferidas mediante el método de Neighbor-Joining (36). El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (39). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Maximum Composite Likelihood (40). Este análisis involucró a 20 secuencias de nucleótidos y todas las posiciones ambiguas fueron eliminadas para cada par de secuencias. El dataset final contiene 1780 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo con el Software MEGA X (35).

## ARNr 16S con las cepas obtenidas para la proteína CTX-M-9



**Figura 13.** Relaciones evolutivas entre taxones de enterobacterias basadas en el gen ARNr 16S (a partir de las cepas obtenidas para la proteína CTX-M-9) inferidas mediante el método de Neighbor-Joining (36). El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (39). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Maximum Composite Likelihood (40). Este análisis involucró a 26 secuencias de nucleótidos y todas las posiciones ambiguas fueron eliminadas para cada par de secuencias. El dataset final contiene 1735 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo con el Software MEGA X (35).

## 8.4 Anexo IV: Script de RStudio para la comparación entre árboles

```
library("ape")

convert_to_ultra <- function(nonultra, method = c("nnls", "extend")){
  method <- method[1]
  if(method=="nnls") nonultra <- nnls.tree(cophenetic(nonultra),
nonultra,
                                     rooted = TRUE, trace = 0)

  else if(method == "extend"){
    h <- diag(vcv(nonultra))
    d <- max(h) - h
    ii <- sapply(1:Ntip(nonultra), function(x,y) which(y==x),
y=nonultra$edge[,2])
    nonultra$edge.length[ii] <- nonultra$edge.length[ii]+d
  } else
    cat("impossible to convert to ultrametric")
  nonultra
}

ARN16S_1<-read.tree(file="E:/SARAH/MÁSTER BIOINFORMÁTICA UOC/TRABAJO
FIN DE MÁSTER/DATOS/SECUENCIAS/Arboles/arbol16STEM12.tree")
TEM12<-read.tree(file="E:/SARAH/MÁSTER BIOINFORMÁTICA UOC/TRABAJO FIN
DE MÁSTER/DATOS/SECUENCIAS/Arboles/arbolTEM12Comp.tree")

TEM12 <- convert_to_ultra(TEM12)
TEM12$root.edge <- 0
TEM12 <- multi2di(TEM12)
ARN16S_1 <- convert_to_ultra(ARN16S_1)
ARN16S_1$root.edge <- 0
ARN16S_1 <- multi2di(ARN16S_1)

dend1 <- as.dendrogram(TEM12)
dend2 <- as.dendrogram(ARN16S_1)

tanglegram(dend1, dend2, main_left = "TEM12", main_right = "ARN16S",
color_lines = c("pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "orange",
"orange", "orange", "orange", "orange", "orange", "orange",
"green"))

ARN16S_2<-read.tree(file="E:/SARAH/MÁSTER BIOINFORMÁTICA UOC/TRABAJO
FIN DE MÁSTER/DATOS/SECUENCIAS/Arboles/arbol16SSHV5.tree")
SHV5<-read.tree(file="E:/SARAH/MÁSTER BIOINFORMÁTICA UOC/TRABAJO FIN
DE MÁSTER/DATOS/SECUENCIAS/Arboles/arbolSHV5Comp.tree")

SHV5 <- convert_to_ultra(SHV5)
SHV5$root.edge <- 0
SHV5 <- multi2di(SHV5)
ARN16S_2 <- convert_to_ultra(ARN16S_2)
ARN16S_2$root.edge <- 0
ARN16S_2 <- multi2di(ARN16S_2)

dend3 <- as.dendrogram(SHV5)
dend4 <- as.dendrogram(ARN16S_2)
```

```

tanglegram(dend3, dend4, main_left = "SHV5", main_right = "ARN16S",
color_lines = c("green", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4",
"pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "orange",
"orange", "orange", "orange", "orange", "orange", "orange"))

ARN16S_3<-read.tree(file="E:/SARAH/MÁSTER BIOINFORMÁTICA UOC/TRABAJO
FIN DE MÁSTER/DATOS/SECUENCIAS/Arboles/arb16SCTMX9.tree")
CTXM9<-read.tree(file="E:/SARAH/MÁSTER BIOINFORMÁTICA UOC/TRABAJO FIN
DE MÁSTER/DATOS/SECUENCIAS/Arboles/arb1CTXM9Comp.tree")

CTXM9 <- convert_to_ultra(CTXM9)
CTXM9$root.edge <- 0
CTXM9 <- multi2di(CTXM9)
ARN16S_3 <- convert_to_ultra(ARN16S_3)
ARN16S_3$root.edge <- 0
ARN16S_3 <- multi2di(ARN16S_3)

dend5 <- as.dendrogram(CTXM9)
dend6 <- as.dendrogram(ARN16S_3)
tanglegram(dend5, dend6, main_left = "CTXM9", main_right = "ARN16S",
color_lines = c("green", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4",
"pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4", "pink4",
"orange", "orange", "orange", "orange", "orange", "orange", "orange",
"orange", "orange", "orange", "orange", "orange", "orange"))

```