

## RESUM

Les betalactamases CTX-M formen una família d'enzims d'espectre ampliat capaços d'hidrolitzar tots els betalactàmics amb l'excepció de l'associació amoxicilina-àcid clavulànic, les cefamicines i els carbapenems. Al 1996, fruit d'un estudi sobre la incidència de BLEAs al nostre entorn, va ser aïllada al nostre laboratori una soca portadora d'una nova betalactamasa, la CTX-M-9. Es va estudiar l'entorn genètic del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> i s'observà que es trobava formant part de l'integró complex de classe 1, In60. La incidència d'aquest enzim va augmentar durant el període 1996-1999 i ens vam plantejar esbrinar el per què d'aquest fet. A partir dels coneixements previs comentats, hipotetitzarem que el gen que codifica la betalactamasa CTX-M-9 es trobava en un plasmidi conjugatiu que possiblement hauria difós per diferents clons bacterians. A més, molt probablement aquest gen podria trobar-se en algun element mòbil, tipus transposó, que encara afavorís més aquesta difusió. Per altra banda i donat que els bacteriòfags són un dels vehicles més eficients a l'hora de transferir fragments de DNA entre les cèl·lules, volíem esbrinar també el seu paper en l'increment dels nivells de resistència, particularment en gramnegatius, durant els últims anys.

Donat que el coneixement precís del possible vector que porta el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> pot ajudar a entendre la ràpida difusió i prevalença d'aquesta betalactamasa al nostre país i preveure la seva futura difusió, es va realitzar un estudi exhaustiu en 33 *Escherichia coli* i 4 *Salmonella enterica* portadores d'aquest gen, aïllades en el període 1996-1999.

La relació clonal entre les soques es descartà mitjançant estudis de macrorestricció genòmica amb l'enzim de baixa freqüència de tall *Xba*I. Posteriorment, s'estudià l'estructura de l'integró In60 en totes les soques de l'estudi, observant-se que existia una ampla variació de la mateixa. Un terç de les soques presentaven deleccions i/o insercions (*ISEc8*, *IS26*, *aadA2* parcial) dintre de l'integró In60, per tant, aquest element genètic portador del gen *bla* semblava no ser una estructura estable sinó susceptible a patir variacions.

Posteriorment, es varen estudiar els perfils plasmídics i es va determinar el grup d'incompatibilitat d'aquests, mitjançant rep *typing* i mitjançant la digestió amb l'enzim *S1*, camp pulsat, *southern-blot* i hibridació amb sondes específiques pels diferents grups d'incompatibilitat. S'observà com el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> es trobava en un plasmidi del grup d'incompatibilitat HI2 derivat del plasmidi de referència R478, en totes les soques menys en dues. En aquestes dues soques, el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> es trobava en un plasmidi repFIB, i en un repFII. Una de les soques de l'estudi presentava el gen *bla* al cromosoma.

L'amplia difusió d'aquest gen en un curt període de temps, la no clonalitat de les soques portadores d'aquest, junt amb la seva localització en diferents estructures genètiques, tant plasmídiques com cromosòmiques, fa pensar que està situat en un element mòbil, en un transposó.

La gran majoria d'estudis relacionats amb la difusió de gens de resistència a antimicrobians es realitzen principalment en soques aïllades de mostres clíniques, on s'estudien els diferents

elements mòbils com a vehiculadors dels gens de resistència. Els elements mòbils estudiats amb més freqüència han estat els plasmidis, juntament amb els transposons i els integrons. És per això que ens plantejarem determinar quin paper podien jugar els bacteriòfags en la difusió de les resistències als antimicrobians.

Aquest estudi es realitzà a partir de l'anàlisi de nou mostres d'aigües residuals, tant humanes (cinc mostres) com animals (tres mostres), amb el propòsit de determinar els bacteriòfags presents en elles com a possibles vehiculadors de gens de resistència a betalactàmics.

L'estudi es va dur a terme mitjançant l'amplificació per PCR d'un ampli ventall de betalactamases d'interès clínic, a partir del DNA aïllat de les partícules víriques purificades de les mencionades aigües residuals. Els resultats varen demostrar la presència de seqüències dels gens *bla<sub>OXA-2</sub>*, *bla<sub>PSE-1/4</sub>* i *bla<sub>PSE</sub>*-relacionada, en l'interior de les partícules víriques.

Els bacteriòfags són, per tant, un vehicle transportador de gens bacterians que es troba al medi ambient que ens envolta i que no podem subestimar.

## SUMMARY

The CTX-M families are extended-spectrum beta-lactamase enzymes (ESBL) that hydrolyse all beta-lactams with the exception of the amoxicillin-clavulanic association, cephamycin and carbapenem. In 1996, in the context of a ESBLs study at our hospital, a strain carrying a new beta-lactamase, the CTX-M-9, was isolated. When the surrounding region of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene was studied, it was observed that it was located in a novel-complex *sul1* integron, the In60. In the 1996-1999 period, the incidence of this enzyme was higher and we decided to investigate the reasons for this. We assumed that this *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene was located in a conjugative plasmid and that the gene had probably spread between different strains. Moreover, this gene would be included within a mobile element such as transposons that could contribute to its diffusion. Finally, as the bacteriophages play an important role in the diffusion of DNA fragments between cells we decided to study whether they, are involved in the diffusion of beta-lactamases.

Knowledge of the possible vector that carries the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene could help to understand and prevent its rapid diffusion and high prevalence in Barcelona. An exhaustive study was performed with 33 *Escherichia coli* and 4 *Salmonella enterica* carrying this gene, isolated during 1996-1999.

The clonal relationship between the strains was disregarded by macrorestriction studies using the *XbaI* enzyme. The In60 structure was later studied in all strains, detecting a high variability. One third of the strains showed a deletion and/or insertion (*ISEc8*, *IS26*, *aadA2* partial) within the In60 integron. Accordingly, this genetic element that contains the *bla* gene seems to be an unstable structure.

We then studied the plasmid pattern using the *ep* typing method and southern-blot of PFGE digested with S1. The membranes obtained were hybridised with specific probes from the different incompatibility groups. In all but two strains the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene was found in a plasmid belonging to the HI2 incompatibility group, which derived from the R478 reference plasmid. In one of the two remaining strains, the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene was found in a plasmid belonging to the IncFIB and in the other it was found in the IncFII incompatibility group. In another strain, however, it was found in the chromosome.

The extended diffusion of this gene in a short period of time, the non-clonal relationship between the strains carrying this gene, and their presence in different genetic structures, plasmidical or chromosomal, reinforce the hypothesis that this gene was located in a mobile genetic element, such as a transposon.

Most studies based on antimicrobial resistance, particularly the mobility of the resistance genes, were made using clinical strains. The mobile genetic elements most studied to date are plasmids, transposons and integrons, but bacteriophages provide one of the most efficient vehicles for moving DNA sequences between bacterial cells.

We therefore evaluated the presence of various beta-lactamase genes within the bacteriophages in five residual humans sewage samples and in three residual animal sewage samples by PCR.

Different primers were used in order to amplify the beta-lactamases of most interest in a clinical context. The results showed the occurrence of phage particles carrying sequences of *bla*<sub>OXA-2</sub>, *bla*<sub>PSE-1/4</sub> and *bla*<sub>PSE</sub>-related genes. Phages may therefore contribute to the spread of some beta-lactamases genes.