

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Estudio de las dinámicas evolutivas del plásmido pOXA-48 en enterobacterias de pacientes hospitalizados

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Javier de la Fuente Hidalgo

DIRECTOR

Álvaro San Millán Cruz

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia



Tesis doctoral

Estudio de las dinámicas evolutivas del plásmido pOXA-48 en
enterobacterias de pacientes hospitalizados

Memoria para optar al grado de Doctor

presentada por:

Javier de la Fuente Hidalgo

Director:

Álvaro San Millán Cruz

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Programa de Doctorado de Microbiología y Parasitología



Tesis doctoral:

Estudio de las dinámicas evolutivas del plásmido pOXA-48 en
enterobacterias de pacientes hospitalizados

Memoria para optar al grado de Doctor

presentada por:

Javier de la Fuente Hidalgo

Director:

Álvaro San Millán Cruz

El Dr. Álvaro San Millán Cruz, Científico Titular en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC),

CERTIFICA QUE:

JAVIER DE LA FUENTE HIDALGO ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor, con el título:

“Estudio de las dinámicas evolutivas del plásmido pOXA-48 en enterobacterias de pacientes hospitalizados”

Por ello, cumpliendo la normativa vigente, informa favorablemente para que proceda a su defensa.

Fdo:

Álvaro San Millán Cruz,

En Madrid a 6 de febrero de 2023.

Agradecimientos

Quiero empezar esta sección nombrando a mis padres, los cuales siempre me han apoyado incondicionalmente en todas las etapas de mi vida.

A l'Alba, que sap que ens ha costat Déu i ajuda arribar fins aquí. T'estimo.

A todas las personas con las que he coincidido en el hospital o en el CNB. A Aída y a Tori, compañeras de tesis con todo lo que eso implica. A Alicia, referencia molecular y muchas cosas más, entre las que se incluye el diseño de la portada de la tesis. A Cris, luchadora y consejera. A Ricardo, perseverante y mentor. A Alfonso, inspirador, clon y población. A Coloma y a Carmen, pacientes compañeras. A Jorge, relevo y potencia. A todas las personas que forman o han formado parte del “piramidín” y con los que he coincidido, en especial a Miguel, Ana Elena, Sonia, Val y a Teresa. A los estudiantes de rotación que han pasado por el laboratorio, de ellos siempre he aprendido algo. Y, sin duda, a todas las personas con las que hemos colaborado en algún momento. Destacando notablemente a toda la gente que ha participado en el estudio R-GNOSIS. Sin su dedicación y trabajo, esta tesis no habría sido posible.

A mis amigos.

A la educación pública.

A la apramicina.

Me gustaría acabar esta sección con las dos personas que han sido mis mayores referentes en este período. Considero a ambas grandes personas y brillantes científicos. Ambos me han contagiado su capacidad de disfrutar de la ciencia y poseen atributos que aspiro tener en algún momento de mi vida. La primera, es Jerónimo Rodríguez Beltrán. Jerónimo ha sido mi compañero de poyata durante los años más importantes del doctorado y me ha enseñado a disfrutar, entre otras cosas, del proceso de maduración de ideas. Considero a Jero mi amigo y, de todas sus virtudes, me quedo con su afabilidad

y su capacidad de aprendizaje constante. La segunda persona, y con la que quiero acabar los agradecimientos, es Álvaro San Millán Cruz. Álvaro me ha abierto un camino dedicándome su tiempo y su esfuerzo. Trabajar con él me ha hecho crecer en muchos aspectos, tanto profesionales como personales. De Álvaro envidio sanamente su generosidad, su visión y su capacidad para solucionar cualquier problema de una forma aparentemente sencilla.

Si he logrado llegar hasta aquí, ha sido porqué he subido a hombros de gigantes.

Índice

1	Índice de Figuras	13
2	Índice de Tablas	15
3	Listado de abreviaturas	17
4	Resumen	19
4.1	Resumen en castellano.....	19
4.2	Resumen en inglés (summary)	20
5	Introducción general	23
5.1	Las bacterias y su interacción con otros organismos	23
5.2	Las bacterias resistentes a antimicrobianos.....	24
5.3	Los mecanismos de diseminación y resistencia a los antimicrobianos.....	25
5.4	Las bacterias del intestino humano.....	29
5.5	Las enterobacterias resistentes a carbapenemas (CRE).....	30
5.6	OXA-48 y los plásmidos pOXA-48	34
5.7	Barreras a la diseminación de los plásmidos.....	37
6	Justificación y objetivos	45
7	Materiales y métodos.....	47
8	Resultados	53
8.1	Capítulo I: Transmisión generalizada de plásmidos tipo pOXA-48 en el intestino de pacientes hospitalizados.....	53
8.1.1	Resumen del capítulo I.....	53
8.1.2	Introducción del capítulo I	54
8.1.3	Métodos específicos del capítulo I	55
8.1.3.1	Diseño del estudio y colección de muestras	55
8.1.3.2	Caracterización bacteriana.....	56
8.1.3.3	Cultivo bacteriano, extracción de DNA y secuenciación	57
8.1.3.4	Análisis filogenético.....	58
8.1.3.5	Identificación de rutas de transmisión entre pacientes	58
8.1.3.6	Identificación de rutas de transmisión plasmídica intra-paciente.....	59
8.1.3.7	Análisis de otros plásmidos pOXA-48 en la base de datos.....	60
8.1.3.8	Ensayos de conjugación en distintas condiciones.....	61
8.1.3.9	Análisis estadísticos.....	62
8.1.4	Resultados específicos del capítulo I	62
8.1.4.1	Pacientes hospitalizados colonizados por CRE portadoras de pOXA-48	62
8.1.4.2	Transferencia entre pacientes de clones portadores de pOXA-48	64
8.1.4.3	Análisis genómico de distintas variantes del plásmido pOXA-48	68
8.1.4.4	Altas tasas de conjugación in vitro de pOXA-48	73

8.2	Capítulo II: Evolución in vivo e intra-paciente de la resistencia a antimicrobianos mediada por el plásmido pOXA-48.....	75
8.2.1	Resumen del capítulo II.....	75
8.2.2	Introducción del capítulo II	76
8.2.3	Métodos del capítulo II	77
8.2.3.1	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	77
8.2.3.2	Construcción de plásmidos sintéticos	78
8.2.3.3	Extracción de DNA genómico y secuenciación.....	79
8.2.3.4	Ensamblaje y análisis de las variantes de pOXA-48	80
8.2.3.5	Introducción de variantes de pOXA-48 (PV) en aislados bacterianos.....	80
8.2.3.6	Análisis genómico de E. coli J53 portadora de distintas PVs	81
8.2.3.7	Ensayos de competición para caracterizar el fitness relativo de las bacterias	82
8.2.3.8	Curvas de crecimiento.....	84
8.2.3.9	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	84
8.2.3.10	Determinación de la tasa de conjugación de las PVs en E. coli J53	85
8.2.3.11	Determinando el número de copias del plásmido (PCN) por PCR cuantitativa (qPCR)	85
8.2.3.12	Curando y reintroduciendo PVs en aislados clínicos.....	86
8.2.3.13	Análisis de la evolución intra-paciente de la AMR mediada por pOXA-48	90
8.2.3.14	Análisis filogenético.....	90
8.2.3.15	Análisis estadístico	91
8.2.4	Resultados específicos del capítulo II	91
8.2.4.1	Análisis de las variantes de pOXA-48	91
8.2.4.2	Buscando eventos de evolución intra-paciente de pOXA-48.....	95
8.2.4.3	Evolución in vivo de la resistencia mediada por pOXA-48.....	98
8.2.4.4	Paciente HKH. Incrementos en PCN, AMR y costes en el fitness bacteriano	98
8.2.4.5	Paciente JWC. Pérdida de AMR y reducción del coste en el fitness bacteriano	99
8.2.4.6	Paciente WDV. Una delección en el plásmido inactiva la conjugación	100
9	Discusión.....	103
9.1	Sobre las rutas de transmisión de las CRE.....	103
9.2	Sobre la evolución de la resistencia mediada por pOXA-48	106
10	Conclusiones	109
11	Bibliografía.....	111
12	Anexo.....	131
12.1	Tabla Anexo 1. Descripción las cepas clínicas aisladas en el Hospital Universitario Ramón y Cajal.	131
12.2	Tabla Anexo 2. Descripción de SNPs en las PVs caracterizadas en el capítulo II.	143

1 Índice de Figuras

FIGURA 1. Muertes humanas globales relacionadas con bacterias resistentes a antimicrobianos en 2019.....	26
FIGURA 2. Mecanismos de transferencia horizontal de plásmidos.....	28
FIGURA 3. Representación de los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en una bacteria gran-negativa.....	34
FIGURA 4. Distribución de enterobacterias con OXA-48 en 2019.....	35
FIGURA 5. Contexto genético de las carbapenemasas tipo OXA-48.....	37
Figura 6. El origen del coste en el fitness bacteriano producido por los plásmidos en sus hospedadores.....	39
FIGURA 7. Mecanismos evolutivos y ecológicos que explican la estabilidad de los plásmidos en las poblaciones bacterianas.....	43
FIGURA 8. Distribución en el tiempo de los aislados de Enterobacterias portadoras de plásmidos pOXA-48 procedentes de pacientes hospitalizados.....	63
FIGURA 9. Análisis filogenético de aislados portadores de pOXA-48 en R-GNOSIS.....	66
FIGURA 10. Reconstrucción de la transferencia entre pacientes de enterobacterias portadoras de pOXA-48.....	67
FIGURA 11. Distribución espacio-temporal de los pacientes colonizados por <i>K. pneumoniae</i> ST11/pOXA-48 en la sala de neurocirugía.....	68
FIGURA 12. Transferencia intra-paciente de pOXA-48.....	71
FIGURA 13. Plásmido pOXA-48.....	72
FIGURA 14. Tasa de conjugación de pOXA-48 en distintas condiciones.....	74
FIGURA 15. Representación de los plásmidos sintéticos utilizados en este estudio.....	79
FIGURA 16. Funcionamiento del sistema CRISPR-Cas9 para curar plásmidos.....	87
FIGURA 17. Procedimientos utilizados para estudiar la evolución intra-paciente de variantes del plásmido pOXA-48.....	89
FIGURA 18. Distribución de las PVs aisladas en el HURYC.....	92
FIGURA 19. Variantes del plásmido pOXA-48 introducidas en <i>E. coli</i> J53.....	94
FIGURA 20. Análisis de la evolución de la AMR mediada por pOXA-48 dentro de los pacientes.....	97
FIGURA 21. Caracterización de la evolución de la AMR mediada por plásmidos.....	101
FIGURA 22. Representación de las dinámicas de transmisión de la resistencia mediada por plásmido pOXA-48 en enterobacterias.....	104
FIGURA 23. Esquema representativo de las trayectorias evolutivas de los plásmidos pOXA-48.....	107

2 Índice de Tablas

Tabla 1. Descripción de cebadores utilizados a lo largo del trabajo. 49

Tabla 2. Descripción de plásmidos sintéticos utilizados a lo largo del trabajo. 52

3 Listado de abreviaturas

Nota del doctorando: a lo largo de la presente tesis doctoral se incluyen todas las abreviaturas y acrónimos en inglés. El motivo de esta decisión es el de facilitar el entendimiento del lector ya que, por ejemplo, PCR o SNP son abreviaturas ampliamente conocidas más allá del mundo de la microbiología, mientras que su transcripción en español (RCP o PIN) podría dificultar la lectura. Por coherencia, para el resto de abreviaturas que sí poseen una versión más reconocible en castellano, se ha mantenido el mismo criterio.

AMC Amoxicilina y ácido clavulánico

AME Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

AMR Resistencia a los antimicrobianos

aTc Anhidrotetraciclina

ATP Adenosín trifosfato

bp Pares de bases de nucleótidos

cfu unidades formadoras de colonias

CRE Enterobacteria resistente a antibióticos carbapenémicos

DNA Ácido desoxirribonucleico

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

ERT Ertapenem

ESBL β -lactamasa de espectro extendido

GAM Modelo aditivo generalizado

GC Guanina y citosina

HGT Transferencia horizontal de genes

HURYC Hospital Universitario Ramón y Cajal

IC90 Concentración inhibitoria del 90% del crecimiento

INDEL Mutación mediante inserción y/o delección

IQR Rango intercuartílico

kb Mil pares de bases de nucleótidos (kilobases).

KPC *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa

LB Caldo de lisogenia Lennox

MALDI-TOF Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz

MBL Metalo- β -lactamasa

MER Meropenem

MGE Elementos genéticos móviles

MH Caldo de Müller-Hinton

MLST Tipificación multi-locus de secuencia

NDM Metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi

OXA Oxacilinas

OTU Unidades taxonómicas operativas

PBP Proteína de unión a la penicilina

PCN Número de copias del plásmido

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PV Variantes estructurales del plásmido pOXA-48

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RNA Ácido ribonucleico

sgRNA guía de cadena simple de ácido ribonucleico

SNP Polimorfismo individual en nucleótido

TGI Tracto gastrointestinal

VIM Metalo- β -lactamasa del Integrón Verona

4 Resumen

En los siguientes subapartados se presenta un resumen general en castellano y otro en inglés del contenido de la tesis doctoral.

4.1 Resumen en castellano

La capacidad de las bacterias para evolucionar en respuesta a cambios en su entorno, ha impulsado la aparición y diseminación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (AMR). Este fenómeno es especialmente preocupante en entornos clínicos, donde las bacterias multi-resistentes dificultan la disponibilidad de tratamientos eficaces para pacientes portadores de bacterias resistentes. En este ámbito, los plásmidos conjugativos juegan un papel determinante en la diseminación y la evolución de AMR en muchos patógenos de relevancia clínica. Los plásmidos conjugativos permiten a las bacterias compartir genes de AMR, haciéndolas sobrevivir en presencia de antimicrobianos. No obstante, los factores ecológicos y evolutivos que determinan el éxito de las asociaciones entre plásmidos y clones bacterianos en ecosistemas de relevancia clínica son poco conocidos.

El principal objetivo de esta tesis doctoral es el de entender cuáles son los factores que influyen en la diseminación y evolución de la resistencia a antibióticos carbapenémicos mediada por plásmidos en el intestino humano. Para ello, se han utilizado como modelo los plásmidos pOXA-48 aislados de pacientes hospitalizados en un hospital de Madrid, España. Los plásmidos pOXA-48 son prevalentes en las enterobacterias y son de especial relevancia clínica al aportar resistencia a los antibióticos carbapenémicos, utilizados en muchos casos como última opción terapéutica para las infecciones por bacterias multi-resistentes. Combinando técnicas que incluyen edición genética, caracterización fenotípica de los clones, análisis de los metadatos de los pacientes y secuenciación de sus genomas, se ha estudiado la diseminación y la evolución de la resistencia mediada por plásmidos pOXA-48 en las enterobacterias de pacientes hospitalizados. En el capítulo I, se caracterizan las rutas de diseminación de la resistencia a antibióticos carbapenémicos mediada por plásmidos pOXA-48 así como las zonas del hospital donde ha ocurrido dicha transmisión. Además, se han detectado eventos de transferencia horizontal (HGT) de plásmidos pOXA-48 entre las enterobacterias de determinados pacientes hospitalizados,

lo que es crucial para entender la epidemiología de la resistencia. En el capítulo II, se describen las dinámicas evolutivas de la resistencia a antibióticos carbapenémicos mediadas por plásmidos pOXA-48. Los resultados muestran la evolución del plásmido durante un período de cuatro años y revelan distintos fenotípos asociados a múltiples mutaciones del plásmido. Asimismo, se describe como la evolución *in vivo* de la AMR mediada por pOXA-48 implica un equilibrio entre los niveles de resistencia y el coste plasmídico. Por primera vez, se identifican eventos de evolución compensatoria *in vivo*, así como la evolución de la AMR mediada por pOXA-48 en bacterias que evolucionan dentro del intestino humano.

4.2 Resumen en inglés (*summary*)

The ability of bacteria to evolve in response to environmental changes has driven the emergence and spread of antimicrobial resistance mechanisms (AMR). This phenomenon is of particular concern in clinical settings, where multi-resistant bacterial infections are difficult to treat. In this scenario, conjugative plasmids play a key role in the dissemination and evolution of AMR in many clinically relevant pathogens. Conjugative plasmids allow bacteria to share AMR genes which permit them to survive in the presence of antimicrobials. However, the ecological and evolutionary factors that determine the success of bacteria-plasmid associations in clinically relevant ecosystems are poorly understood.

The main objective of this thesis is to further understand the factors that determine the dissemination and evolution of plasmid-mediated resistance to carbapenem antibiotics in the human gut. For this purpose, we used pOXA-48-like plasmids isolated from hospitalised patients in a hospital in Madrid (Spain) as a model. pOXA-48-like plasmids are prevalent in enterobacteria and are of particular interest in clinical settings as they provide resistance to carbapenem antibiotics. Carbapenem antibiotics are commonly used as last resort antibiotics for infections caused by multi-resistant bacteria.

We combined gene editing techniques, phenotypic characterization and genome sequencing data with patients' metadata analyses, to study the dissemination and evolution of pOXA-48-like plasmids. In chapter I, we characterized the dissemination routes of pOXA-48-like plasmids. We detected specific areas of the hospital where pOXA-

48-carrying enterobacteria had been transmitted between patients. And crucially, we detected several events of pOXA-48 horizontal transmission within a subset of hospitalised patients. In Chapter II, we focused on studying the evolutionary dynamics of pOXA-48-mediated carbapenem resistance. First, we identified pOXA-48 mutations which appeared and were selected within the gut of patients over a 4-year period. Then, we characterized a subset of representative mutations which conferred different phenotypes/genotypes. To finish, we followed the pOXA-48-mediated AMR evolution within three different patients. We unveiled how plasmid-AMR evolution is shaped by a trade-off between plasmid associated costs and AMR. Here, for the first time, we characterized the *in vivo* plasmid compensatory evolution in bacteria evolving within the human gut.

5 Introducción general

5.1 Las bacterias y su interacción con otros organismos

Las bacterias son organismos microscópicos que habitan la Tierra desde hace miles de millones de años¹⁻⁴ y son hoy en día, uno de los organismos celulares más diversos y abundantes del planeta^{5,6}. Esto se debe en gran medida a que el metabolismo bacteriano es muy versátil y puede evolucionar rápidamente, permitiendo a las bacterias adaptarse a un sinnúmero de ecosistemas^{6,7}. Actualmente, se pueden encontrar bacterias en infinidad de ambientes, desde las hirvientes aguas de las fuentes termales de Yellowstone⁸, pasando por las ácidas aguas de Río Tinto⁹, hasta en los oscuros y fríos lagos del Antártico¹⁰.

La adaptabilidad y la interacción de las bacterias con su entorno ha sido un factor clave en la aparición y expansión de las formas de vida eucarióticas de las que descendemos. Esto puede ilustrarse en el debatido rol de las cianobacterias en la oxigenación de la atmósfera^{11,12} o en el hipotetizado origen bacteriano de determinados orgánulos eucariotas, como las mitocondrias y los cloroplastos, que se originaron tras un proceso de endocitosis celular¹³. Actualmente se pueden encontrar ejemplos de interacciones bacterianas con una amplia gama de organismos incluyendo plantas, animales y hongos. Estas interacciones pueden ser positivas, e incluir relaciones como el comensalismo, el sinergismo y el mutualismo^{14,15}. Por ejemplo, algunas especies de bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de formar asociaciones con varias familias de vegetales en las que la planta proporciona azúcares derivados de su metabolismo. Estos azúcares son aprovechados por las bacterias que, a su vez, proporcionan nitrógeno a la planta¹⁶. Por otro lado, las bacterias también pueden interactuar negativamente con otros organismos^{14,15}. Las bacterias del género *Vampirococcus* depredan a varias especies de bacterias del género *Chromatium*¹⁷ y la bacteria *Wolbachia* es un parásito común de nemátodos y artrópodos¹⁸. Además, las interacciones de la pared celular bacteriana de bacterias con otros organismos también incluyen casos de depredación, parasitismo, competición y amensalismo^{14,15}.

Desde una perspectiva humana, las bacterias están presentes desde nuestra historia más temprana. Históricamente, los humanos hemos aprovechado la diversidad del metabolismo bacteriano para modificar y conservar alimentos en nuestro beneficio¹⁹⁻²¹.

Más recientemente, con el avance en el estudio de las mismas, hemos visto que también nos podemos beneficiar utilizándolas en más procesos, como la producción de compuestos químicos^{22,23}, en nuevas aplicaciones agroalimentarias²⁴⁻²⁶ o en nuevas técnicas de biología molecular, como los sistemas CRISPR-Cas9²⁷ o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)²⁸, que abren el camino a nuevas aplicaciones tecnológicas. No obstante, la relación del ser humano con las bacterias va más allá de su uso en procesos biotecnológicos. Se estima que el cuerpo humano contiene al menos tantas células microbianas como somáticas y, de aquellas, las bacterias son una fracción importante²⁹⁻³¹. Se han detectado comunidades bacterianas en diversas localizaciones del cuerpo humano, con las cuales llevamos mucho tiempo conviviendo^{32,33} y cuya interacción es esencial para nuestra salud^{29,30,34}. Por otro lado, algunas especies bacterianas son también importantes patógenos humanos. Patógenos bacterianos como *Yersinia pestis* o *Vibrio cholerae* pueden provocar importantes enfermedades y han sido los causantes de varias pandemias en la historia de la humanidad^{35,36}. Sin embargo, el hallazgo de la penicilina en 1928 permitió controlar múltiples enfermedades infecciosas de origen bacteriano y desde entonces, se han descubierto muchos compuestos antimicrobianos que se han usado para salvar millones de vidas humanas³⁷⁻⁴⁰.

5.2 Las bacterias resistentes a antimicrobianos

Un agente antimicrobiano es una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos⁴¹, siendo los antibióticos aquellos antimicrobianos que tienen como diana a las bacterias^{42,43}. Antes del siglo XX las enfermedades infecciosas causadas por bacterias representaban una elevada morbilidad y mortalidad en todo el mundo y no fue hasta el descubrimiento de la penicilina y el uso clínico de los antimicrobianos a mediados del siglo XX cuando mejoraron las perspectivas de supervivencia de los pacientes afectados por infecciones bacterianas. El uso de los antibióticos incrementó notablemente la esperanza de vida, dejando las enfermedades infecciosas en un segundo plano como principales causas de mortalidad^{37,39}. Además, los antibióticos también han permitido el desarrollo y la aplicación de otros procedimientos médicos, como la cirugía, las prótesis o los tratamientos que deprimen el sistema inmunitario (por ejemplo, la quimioterapia para el cáncer). Por estos motivos, la eficacia de los antibióticos es esencial

en la medicina moderna. Sin embargo, la capacidad de las bacterias para evolucionar en respuesta a los cambios en su entorno, junto con la sobreexposición de las bacterias a los antibióticos^{44,45}, ha impulsado el desarrollo y la difusión de mecanismos de resistencia antimicrobiana (AMR) en las bacterias^{46,47}. Este fenómeno puede ejemplificarse en como el uso considerable de sulfonamidas en Japón tras la Segunda Guerra Mundial ayudó a la selección y propagación de cepas de *Escherichia coli* resistentes a las sulfonamidas⁴⁸. Posteriormente se introdujeron antibióticos como la estreptomina, el cloranfenicol y la tetraciclina para el tratamiento de las bacterias resistentes a las sulfonamidas y en pocos años se detectaron cepas de *E. coli* resistentes a los cuatro antibióticos⁴⁹. Actualmente, tras muchos años del uso de antimicrobianos en la práctica clínica, cada vez cuesta más encontrar tratamientos eficaces para las infecciones por bacterias multirresistentes. En Europa, las bacterias resistentes a antimicrobianos son responsables de decenas de miles de muertes cada año, y en todo el mundo, más de un millón de muertes se asociaron directamente a bacterias resistentes a antimicrobianos en 2019⁴⁷ (Fig. 1). En este escenario, las predicciones sobre las infecciones por bacterias AMR no son optimistas. Las infecciones por bacterias AMR van al alza^{46,47} y existe un estancamiento en el descubrimiento de nuevas familias de antibióticos⁵⁰. De hecho, estudios recientes indican que en unas décadas las infecciones por bacterias AMR podrían convertirse en la primera causa de muerte en todo el mundo y además producirán altos costes socioeconómicos^{51,52}. Todas estas predicciones ponen de manifiesto la necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para luchar contra las bacterias resistentes a los antimicrobianos.

5.3 Los mecanismos de diseminación y resistencia a los antimicrobianos

Las bacterias pueden ser resistentes a los antimicrobianos a través de dos formas no excluyentes: (1) mecanismos intrínsecos y (2) mecanismos adquiridos⁴⁸. Los mecanismos intrínsecos de resistencia a los antimicrobianos son los derivados de la fisiología de algunas bacterias. Un buen ejemplo son las bombas de eflujo AcrAB/TolC de *E. coli*, que tienen una amplia especificidad de sustrato y pueden exportar diferentes clases de antibióticos junto con otras sustancias⁵³. Otros ejemplos son los mecanismos de

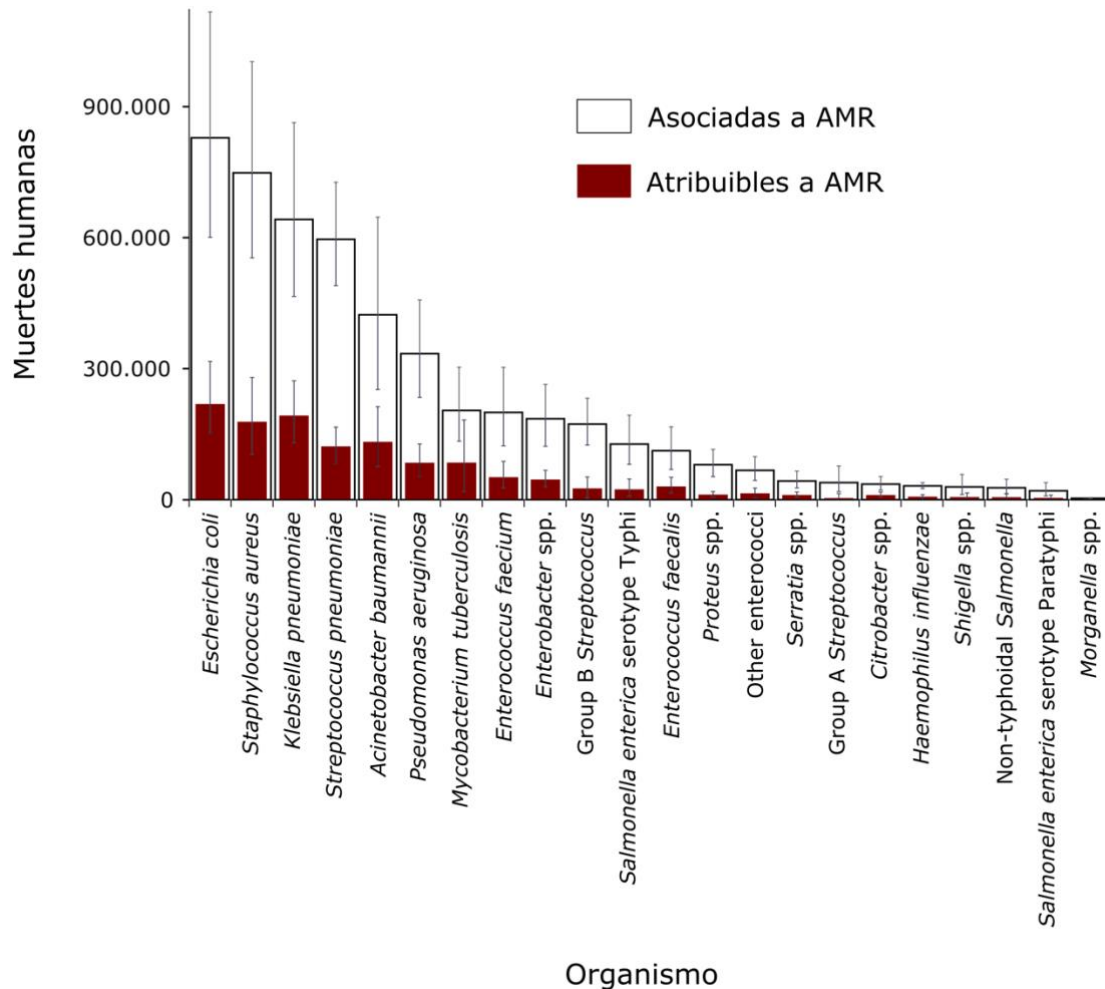


FIGURA 1. Muertes humanas globales relacionadas con bacterias resistentes a antimicrobianos en 2019

Las estimaciones se calcularon por resistencia agrupada según los tipos de fármacos, teniendo en cuenta la co-ocurrencia de la resistencia a múltiples fármacos por organismo. Las barras de error muestran los intervalos de confianza del 95%. Figura modificada de Murray *et al.*⁴⁷.

resistencia de las bacterias Gram-negativas a la vancomicina, basados en la permeabilidad derivada de la membrana externa⁵⁴.

Por otro lado, las bacterias también pueden adquirir nuevos mecanismos de resistencia. Estos mecanismos pueden ser consecuencia de la mutación o recombinación de genes bacterianos involucrados en procesos fisiológicos bacterianos esenciales como la síntesis de la pared celular, la membrana, la síntesis de proteínas o el procesamiento de ácidos nucleicos, las dianas de acción de los antimicrobianos^{48,51}. Por ejemplo, la resistencia a fluoroquinolonas puede atribuirse a mutaciones en los complejos de procesamiento del

DNA⁵⁵ o la resistencia a los antibióticos β -lactámicos pueden relacionarse con mutaciones en genes esenciales para la biosíntesis de la pared celular bacteriana^{54,56}. Además de eventos de adquisición de resistencia mediados por mutaciones y/o recombinaciones, las bacterias también pueden adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antimicrobianos de otros organismos. Este fenómeno se conoce como transferencia genética horizontal (HGT)⁵⁷ y es una de las principales fuerzas que impulsan la evolución de las células procariotas^{58,59}. La HGT permite que organismos filogenéticamente distantes compartan un contenido genético común, lo que difumina los límites entre las distintas ramas taxonómicas⁵⁸⁻⁶⁰. El intercambio de genes mediante HGT implica, en muchos casos, elementos genéticos móviles (MGE).

Los MGE son secuencias de DNA con capacidad de desplazarse dentro de las células y/o entre ellas y que codifican proteínas que median en su transferencia⁵⁷. Entre los MGE, los plásmidos son uno de los principales vehículos impulsores de los mecanismos de resistencia antimicrobiana en las bacterias⁶¹⁻⁶⁵. Los plásmidos bacterianos son moléculas de DNA capaces de replicarse independientemente del cromosoma⁶⁶. Los plásmidos son muy diversos y pueden variar en tamaño, número de copias, contenido de guanina y citosina (GC), mecanismo de replicación, modo de transmisión⁶⁷, topología del DNA (circular o lineal), carga genética y rango de huéspedes. Los plásmidos codifican un amplio catálogo de genes que pueden ampliar el nicho ecológico de sus huéspedes proporcionando a las bacterias nuevas capacidades metabólicas, como lo son los genes de AMR. Determinados genes de resistencia como ciertas β -lactamasas⁶⁸⁻⁷⁰ o genes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) están estrechamente vinculados a plásmidos^{71,72} y son especialmente relevantes en entornos clínicos⁷³⁻⁷⁵. Además, muchos plásmidos se asocian con otros MGE, como transposones^{68,76} que pueden ser portadores de múltiples determinantes de resistencia. Esto hace que ciertos plásmidos permitan a las bacterias ser multi-resistentes en un solo paso de selección, representando una amenaza en los entornos clínicos.

Los plásmidos pueden transferirse verticalmente de células progenitoras a sus descendientes mediante la replicación y segregación plasmídica a las células hijas. Además, los plásmidos también pueden transferirse horizontalmente entre bacterias (Fig. 2), donde la conjugación bacteriana es uno de los principales mecanismos de movilidad⁷⁷⁻⁸⁰.

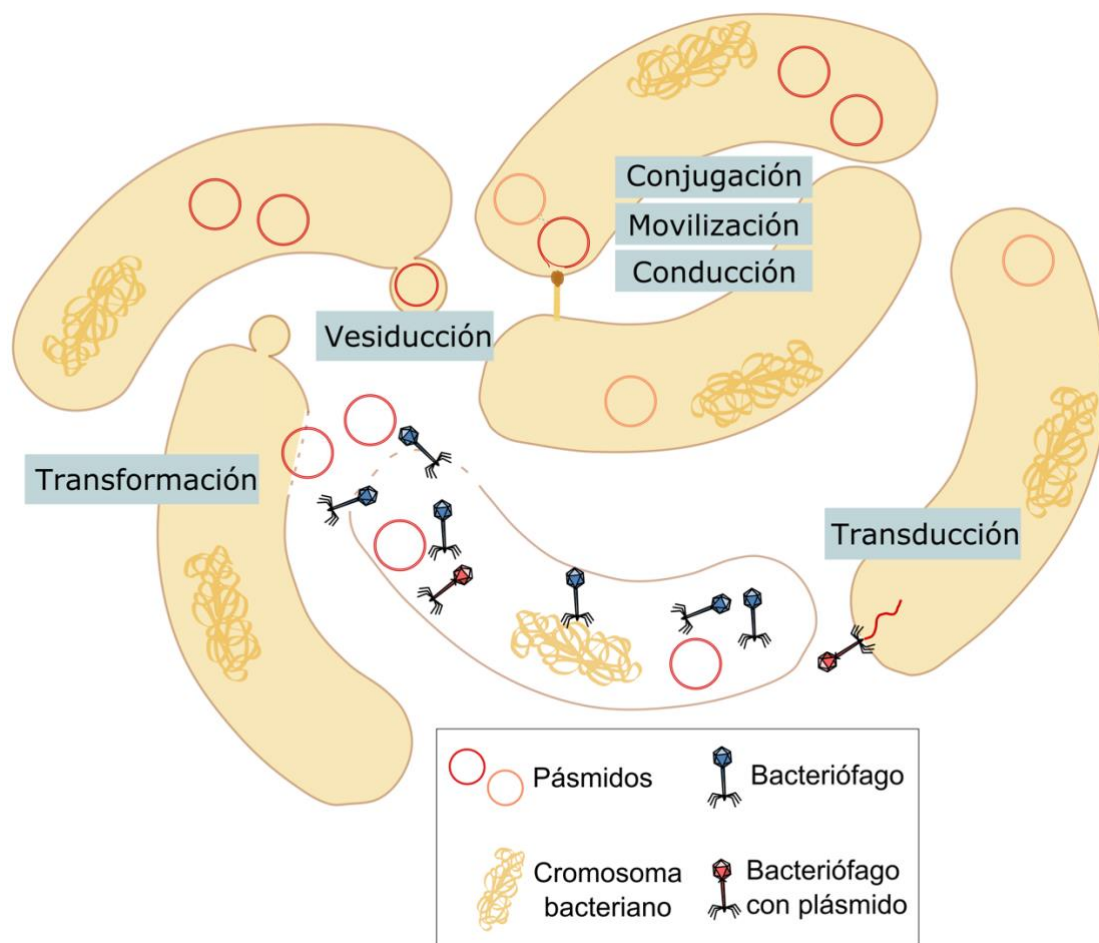


FIGURA 2. Mecanismos de transferencia horizontal de plásmidos.

La conjugación puede producirse entre organismos filogenéticamente lejanos y requiere de un contacto célula-célula que implique la formación del complejo conjugativo. La movilización permite que los plásmidos que carecen de parte de la maquinaria de conjugación, sean transferidos utilizando la maquinaria de otros elementos de la célula. Diversos estudios sugieren que la movilización de plásmidos es un mecanismo importante de propagación de plásmidos^{79,81,82}. La conducción⁸³ se produce a través de la cointegración mediante la recombinación de plásmidos no movilizables y movilizables o conjugativos. El plásmido co-integrado se transfiere entonces a un nuevo receptor, donde puede escindirse. La transducción de plásmidos se produce cuando un virus bacteriófago empaqueta el DNA del plásmido en partículas virales e infecta otra bacteria⁸⁴, una vez dentro del nuevo huésped. La transformación de plásmidos es la captación de DNA plasmídico libre por parte de los organismos y se estima que la transformación se produce en bajas frecuencias ya que está limitada por la presencia de plásmidos libres en el medio ambiente y por la fisiología del huésped⁶⁷. Estudios recientes muestran la presencia de otros mecanismos no canónicos de propagación de plásmidos. Se ha detectado que algunos plásmidos utilizan vesículas especializadas para su diseminación en un proceso llamado como vesiducción⁸⁵. Poco se conoce de este proceso, pero se cree que ocurre especialmente en las biopelículas⁸⁶. También se ha sugerido la transmisión de plásmidos a través de conexiones intracelulares mediadas por nanotubos⁸⁷. No obstante, la

transferibilidad de los plásmidos en entornos naturales puede ser muy distinta entre entornos y las mediciones directas de la transferencia en el medio ambiente siguen siendo escasas. Figura modificada de Rodríguez-Beltrán *et al.*⁶⁶.

5.4 Las bacterias del intestino humano

Las bacterias habitan la Tierra desde hace al menos 3.500 millones de años³ y son uno de los organismos más abundantes de la biosfera^{1,2}. El cuerpo humano alberga una gran cantidad de microorganismos, incluyendo comunidades de bacterias, arqueas, virus y hongos²⁹. Al conjunto de estas comunidades microbianas asociadas al cuerpo humano se las conoce como el microbioma humano²⁹. Los principales hábitats microbianos asociados a humanos se encuentran principalmente en las superficies de la piel⁸⁸, el sistema respiratorio⁸⁹, urinario⁹⁰ y reproductor⁹¹, la cavidad oral⁹² y el tracto gastrointestinal (TGI)⁹³, siendo la composición de estos microbiomas específica del lugar del cuerpo en el que se encuentran. En las comunidades microbianas de vida libre en entornos como el suelo o el agua, se han identificado más de 50 filos bacterianos distintos, pero sólo 4 son dominantes en las comunidades bacterianas humanas: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Esto sugiere, que la coevolución a lo largo de cientos de millones de años ha seleccionado una comunidad específica de microbios adaptados al cuerpo humano^{32,33}.

El intestino humano forma parte del TGI y contiene una de las comunidades microbianas humanas más diversas y abundantes y, de hecho, se estima que es uno de los hábitats bacterianos más densamente poblados del planeta. El intestino contiene entre 30 y 400 x 10¹² células microbianas que incluyen más de 2.000.000 genes, centenares de géneros⁹⁴⁻⁹⁶ y más de 1.000 especies^{29,31}, de las que los filos bacterianos mayoritarios son los *Firmicutes* y *Bacteroidetes*⁹⁷⁻⁹⁹. La composición del microbioma intestinal es característica de cada huésped¹⁰⁰, varía a lo largo de su vida^{95,101,102} y puede verse afectada por el estilo de vida del huésped^{30,96,103,104}. Cambios en la estructura y contenido de las comunidades microbianas intestinales se vinculan con diversas patologías, como el cáncer¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, afecciones inflamatorias^{108,109}, metabólicas¹¹⁰⁻¹¹², neurológicas¹¹³, cardiovasculares¹¹⁴⁻¹¹⁶ y respiratorias¹¹⁷. Además, se ha demostrado que la estabilidad del ecosistema y de las comunidades bacterianas desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la resistencia a la colonización frente a potenciales patógenos^{118,119}.

Muchas de las terapias con antibióticos utilizadas para prevenir y tratar infecciones bacterianas tienen una actividad de amplio espectro. Esto afecta a los patógenos específicos y también a otros miembros del microbioma humano¹²⁰⁻¹²³. Además, la sobrexposición continuada a los antibióticos unida a la gran abundancia y diversidad de células bacterianas y su capacidad para adaptarse a nuevos ambientes ha hecho del intestino humano uno de los nichos más importantes de evolución y diseminación de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos^{63,124-126}. En el intestino humano se dan las condiciones para que las bacterias resistentes a antimicrobianos pueden proliferar e intercambiar genes AMR mediante HGT hacia especies patógenas y oportunistas^{127,128}. Entre estas últimas, uno de los grupos de patógenos más relevantes son las enterobacterias, las cuales son especialmente preocupantes en ambientes hospitalarios^{47,124,127}.

5.5 Las enterobacterias resistentes a carbapenemas (CRE)

Las enterobacterias (orden taxonómico *Enterobacterales*) son bacterias gramnegativas que comprenden más de 50 géneros y 200 especies^{29,129}. Los miembros de esta familia están ampliamente distribuidos en diferentes nichos ecológicos, incluyendo el medio ambiente, las plantas y los animales¹³⁰. Las enterobacterias son comensales comunes del microbioma humano intestinal de pacientes sanos (0,1-1% en abundancia relativa¹³¹). No obstante, este grupo también incluye importantes patógenos que pueden causar diversas infecciones graves, como infecciones del torrente sanguíneo, neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones abdominales¹³⁰. Por lo tanto, la aparición de cepas resistentes a tratamientos con antimicrobianos representa una importante amenaza socioeconómica y clínica¹³². Comúnmente, las infecciones causadas por enterobacterias se han tratado con antibióticos β -lactámicos¹³³ y, como consecuencia, ha aumentado la prevalencia de las infecciones causadas por enterobacterias resistentes a los antibióticos β -lactamámicos de espectro extendido (ESBL)^{133,134}. Para tratar dichas infecciones, especialmente en ambientes clínicos, se han introducido los antibióticos carbapenémicos o carbapenemas¹³⁵⁻¹³⁷, resultando en la aparición y aumento de infecciones debidas a enterobacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos (CRE). Hoy en día, los antibióticos carbapenémicos se utilizan como tratamiento de último recurso para las

infecciones bacterianas por bacterias multi-resistentes¹³⁸. No obstante, la diseminación de mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos también está aumentando rápidamente^{47,132}. Las enterobacterias pueden portar múltiples plásmidos con genes con resistencia a antimicrobianos^{73,75} y un estudio destacó a cepas resistentes a carbapenemas de *Klebsiella pneumoniae*¹³⁹ como la amenaza de salud pública relacionada con la AMR de más rápido crecimiento en Europa entre 2007 y 2015⁴⁶. Además, hoy en día los fármacos de último recurso para las infecciones causadas por CRE son las polimixinas, como la colistina. No obstante, estos tratamientos pueden resultar tóxicos para los pacientes y la resistencia a estos antibióticos también está aumentando^{140,141}. Esto hace que las opciones de tratamientos para las infecciones por CRE sean muy limitadas^{142,143}, siendo especialmente preocupantes en pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos^{144–146}.

Las CRE se definen como enterobacterias resistentes a al menos uno de los antibióticos carbapenemas¹⁴⁷. Los carbapenemas son miembros de la familia de antibióticos β -lactámicos, que contienen un anillo β -lactámico compuesto por un átomo de nitrógeno y tres de carbono¹⁴⁸. Los antibióticos β -lactámicos pueden clasificarse en cinco grupos distintos según la estructura de su anillo central: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, inhibidores de betalactamasas y carbapenemas¹⁴⁹. Los antibióticos β -lactámicos actúan afectando a la biosíntesis del peptidoglicano. El peptidoglicano o mureína es un constituyente esencial de la pared celular bacteriana y está muy conservado tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas. El peptidoglicano se compone de cadenas de glicanos formadas por N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. La parte N-acetilmurámica está unida a ramificaciones de pentapéptidos o tetrapéptidos también muy conservados¹⁵⁰. Los antibióticos β -lactámicos inhiben el último paso de la síntesis del peptidoglicano mediante la acilación de las transpeptidasas implicadas en la reticulación de los péptidos para formar el peptidoglicano, a estas proteínas se las conoce como proteínas de unión a las penicilinas (PBP). La unión de los antibióticos a las PBP interrumpe el proceso de transpeptidación terminal e induce la lisis celular^{148,151,152}.

Las bacterias pueden ser resistentes a los antibióticos carbapenémicos mediante diferentes mecanismos (Fig. 3). Algunas bacterias son intrínsecamente resistentes al presentar una reducida capacidad de captación de moléculas con una menor

permeabilidad de la membrana externa¹⁵³. Se ha detectado que una alteración de las porinas que reduzca la permeabilidad de la membrana externa combinada con la sobreproducción de una cefalosporinasa, AmpC, también puede incrementar la tolerancia a los carbapenemas^{139,154}. Otro mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos consiste en la aparición de variantes con cambios en la secuencia de las PBP, su diana de acción. Estos cambios pueden alterar la afinidad de dichos antibióticos y así conferir resistencia a los β -lactámicos por parte de las bacterias que los presentan. No obstante, los carbapenemas tienen una alta capacidad de unión a distintas PBPs, lo que dificulta la resistencia a carbapenemas mediada por alteraciones de las PBP^{155,156}. Con esto, el principal mecanismo de resistencia bacteriana a los carbapenemas es la producción de carbapenemasas.

Las carbapenemasas son enzimas β -lactamasas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico lo que conduce a la inactivación del antibiótico¹⁵⁷. Las carbapenemasas pueden inactivar a los carbapenemas y a otros antibióticos β -lactámicos como los monobactámicos, las penicilinas y las cefalosporinas¹⁴⁸. Las carbapenemasas son de especial relevancia clínica, ya que son uno de los mecanismos más extendidos de resistencia a los carbapenemas¹⁵⁸. Las carbapenemasas se encuentran distribuidas en la clasificación molecular de Ambler de las β -lactamasas en las clases A, B y D¹⁵⁹. Las carbapenemasas incluidas en la clase A son capaces de hidrolizar una amplia gama de antibióticos β -lactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenemas y el aztreonam¹⁶⁰. Estas carbapenemasas incluyen la carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae* KPC, una de las carbapenemasas más relevantes desde el punto de vista clínico¹⁶¹. En la clase B se incluye a las *metalo- β -lactamasas* (MBL) las cuales son llamadas así por la presencia del metal Zn^{2+} , necesario para hidrolizar el anillo β -lactámico¹⁶². Este grupo es muy diverso y puede hidrolizar la mayoría de los antibióticos β -lactámicos. Sin embargo, confieren una baja resistencia a los monobactámicos y pueden ser inhibidos por agentes catiónicos divalentes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Dos de las carbapenemasas más relevantes desde el punto de vista clínico se incluyen en este grupo son la metalo- β -lactamasa asociada al integrón de Verona (VIM) y la metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM). Las carbapenemasas de clase D también conocidas como oxacilinasas, debido a su capacidad para degradar la oxacilina¹⁶³. Las oxacilinasas están agrupadas en una clase heterogénea de enzimas, ya sea respecto a sus propiedades estructurales o

bioquímicas¹⁶⁴. No obstante, existe un principio general: las enzimas oxacilinasas son resistentes a los inhibidores de los β -lactámicos, como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam, y confieren resistencia a las amino-, carboxi- y ureidopenicilinas¹⁶⁵. Sin embargo, muchas presentan una débil actividad contra los carbapenemas⁵⁶. En el 2010 se propuso una clasificación en 4 grupos de las oxacilinasas¹⁶⁴. En el grupo I se incluyeron oxacilinasas de espectro reducido que no tienen una elevada actividad contra las cefalosporinas o los carbapenemas. Este grupo incluye los subgrupos OXA-1, OXA-2 y OXA-101. El grupo II incluye las oxacilinasas adquiridas de espectro extendido que son capaces de hidrolizar ciertas cefalosporinas de espectro extendido (especialmente la ceftriaxona y la cefepima) y que suelen ser mutantes puntuales de las β -lactamasas de clase D. El grupo III incluye a las enzimas con débil actividad contra los carbapenémicos que no hidrolizan significativamente las cefalosporinas de espectro extendido. Un subgrupo importante de estas enzimas, denominadas enzimas OXA-23-like, es una causa muy importante de resistencia a los carbapenémicos en *Acinetobacter spp*¹⁶⁶. Otro subgrupo, denominado enzimas OXA-48-like, son exitosos entre las enterobacterias y es una de las carbapenemasas más prevalentes en países del mediterráneo¹⁶⁷. El grupo IV está formado por las β -lactamasas de clase D cromosomales de varias bacterias Gram negativas no fermentadoras e incluye el subgrupo de OXA-51 en *Acinetobacter baumannii*¹⁶⁷.

Los genes codificantes de carbapenemasas suelen estar codificados en plásmidos, los cuales juegan un papel esencial en su diseminación^{68,81,168}. No obstante, los sistemas de propagación y evolución de dichas resistencias son diversos¹⁶⁹. Por ejemplo, los genes *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} se transmiten a través de múltiples plásmidos en múltiples linajes bacterianos, los genes *bla*_{KPC} a través de múltiples plásmidos en un mismo linaje bacteriano y los genes *bla*_{OXA-48-like} son comúnmente transmitidos a través de un mismo plásmido en múltiples especies bacterianas. Estas distintas trayectorias deben ser consideradas para predecir y diseñar nuevas intervenciones que contengan la diseminación de las CRE.

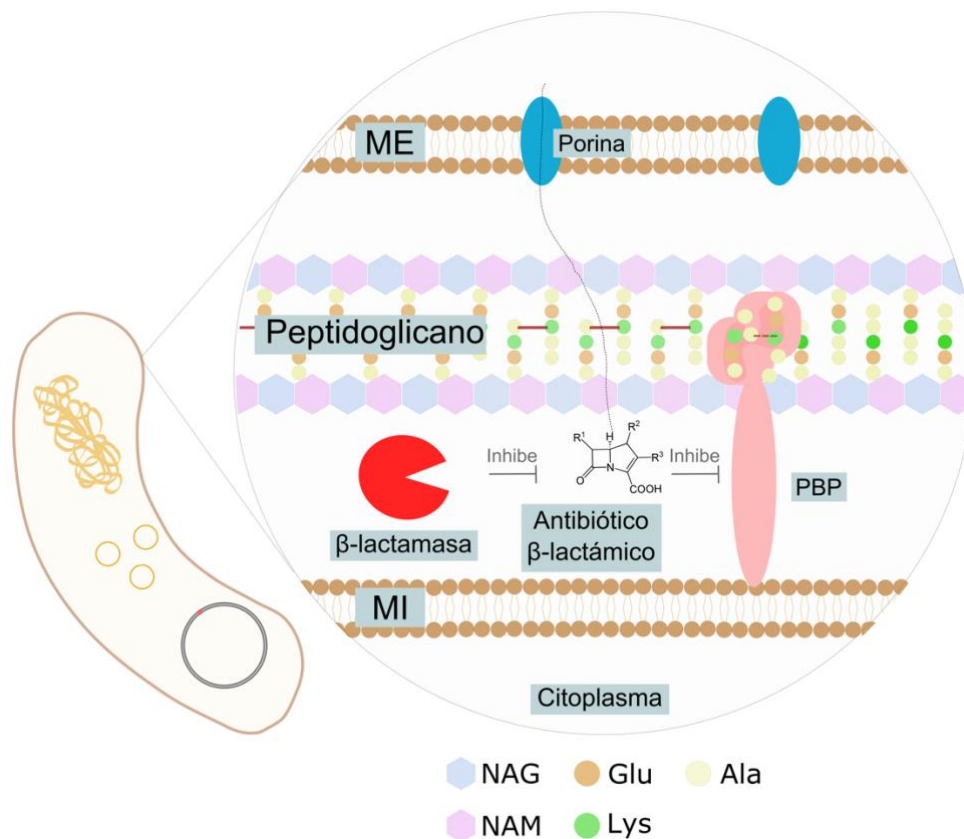


FIGURA 3. Representación de los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en una bacteria gran-negativa

Los antibióticos β -lactámicos actúan afectando a la biosíntesis del peptidoglicano que es un constituyente esencial de la pared celular bacteriana. Los principales mecanismos de resistencia frente a los antibióticos carbapenémicos son: (1) la alteración de la permeabilidad de la membrana externa (ME en la figura), (2) la expresión de bombas de expulsión y (3) la producción de enzimas capaces de hidrolizar el antibiótico. En la figura la membrana externa e interna se indican con las siglas ME y MI respectivamente. La N-acetilglucosamina (NAG) se indica en un hexágono azul, el ácido N-acetilmurámico (NAM) en un hexágono rosa y los aminoácidos alanina, ácido glutámico y lisina bajo las siglas Ala, Glu y Lys en amarillo, naranja y verde respectivamente.

5.6 OXA-48 y los plásmidos pOXA-48

Las enzimas OXA-48-like son carbapenemasas de tipo D y también son conocidas como oxacilinasas, debido a su capacidad de degradar a la oxacilina¹⁶³. Las oxacilinasas incluyen una amplia gama de enzimas¹⁶⁷ como: OXA-48, OXA-162, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-24, OXA-436, OXA-484 y OXA-519. Estudios epidemiológicos muestran como las carbapenemasas OXA-48-like son las segundas carbapenemasas más comunes entre las enterobacterias a nivel mundial, por detrás de las KPC^{170,171}, aunque dependiendo de la zona geográfica pueden ser las primeras¹⁷². Varios miembros de las

enterobacterias productoras de enzimas OXA-48-like son responsables de infecciones hospitalarias, como *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* spp., *Proteus mirabilis*, *Kluyvera* spp., *Salmonella* spp. y *Klebsiella* spp., y *K. pneumoniae*, la cual es la bacteria más comúnmente asociada a infecciones clínicas por bacterias productoras de OXA-48 nivel mundial^{46,47,139,170,171}.

La enzima OXA-48 es la oxacilinas más abundante¹⁶⁷ y se identificó por primera vez en 2001 en un aislado clínico de *K. pneumoniae* obtenido de un paciente en Estambul, Turquía¹⁷³. La cepa de *K. pneumoniae* productora de OXA-48 se encontraba infectando el tracto urinario inferior de un paciente y resultaba especialmente preocupante porque era resistente a una amplia gama de antibióticos como aminoglucósidos, el cloranfenicol, la ciprofloxacina, la rifampicina, las sulfonamidas y la tetraciclina. Además, a estas resistencias se sumó la aportada por la OXA-48 que también permitía a esta *K. pneumoniae* hidrolizar penicilinas y carbapenémicos como el imipenem y el ertapenem. Rápidamente, se detectaron otras bacterias *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de OXA-48 que se extendieron gradualmente a otras partes de Turquía causando varios brotes asociados a estancias hospitalarias^{174,175}. Posteriormente, se detectaron diferentes enterobacterias productoras de OXA-48 en otras regiones como Bélgica¹⁷⁶, Egipto¹⁷⁷, Líbano¹⁷⁸, Francia¹⁷⁹, Túnez¹⁸⁰, Marruecos¹⁸¹, Senegal¹⁸², Países Bajos¹⁸³, España^{184,185}, Irlanda¹⁸⁶, Israel¹⁸⁷ y Eslovenia¹⁸⁸. En la actualidad, las enterobacterias productoras de OXA-48 son endémicas de países del mediterráneo y están distribuidas por todo el mundo (Fig. 4)¹⁶⁷.

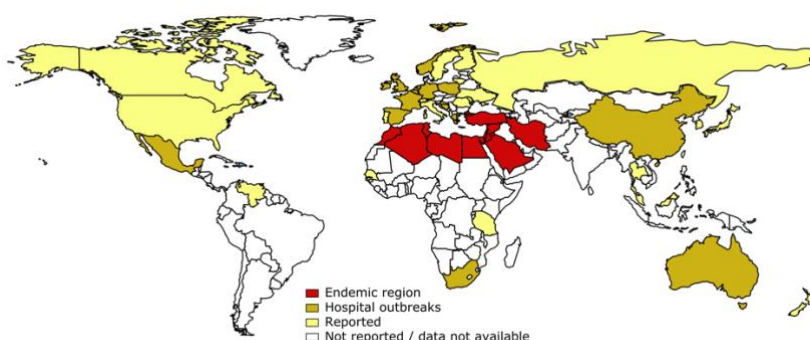


FIGURA 4. Distribución de enterobacterias con OXA-48 en 2019.

El color indica la presencia de enterobacterias productoras de OXA-48 en cada región: endémica (rojo), brotes hospitalarios (amarillo oscuro), casos aislados (amarillo claro) y no detectados o datos no disponibles (blanco). Datos obtenidos de Pitout *et al.*¹⁶⁷.

Un rasgo clave para entender la epidemiología de las bacterias productoras de OXA-48, es que el gen que contiene la secuencia codificante de la enzima OXA-48, denominado *bla*_{OXA-48}, se encontró inicialmente en un plásmido de aproximadamente 70 kb¹⁷³. Después de la diseminación geográfica de OXA-48, era común aislar diferentes especies bacterianas que contenían plásmidos virtualmente idénticos que albergaban este gen a partir de muestras pertenecientes a un mismo paciente, lo que sugiere eventos de transferencia genética horizontal (HGT)¹⁸⁹. Hoy sabemos que los plásmidos son agentes clave en la diseminación y la evolución de las enzimas OXA-48-like entre las enterobacterias^{159,167,169,190,191}. Se hipotetiza que el gen *bla*_{OXA-48} estaba inicialmente presente en el cromosoma de *Shewanella* spp. . No obstante, mediante distintos eventos de captura y movilización mediada por MGE, especialmente el transposón Tn1999, se movilizó desde el cromosoma de *Shewanella* spp. a plásmidos conjugativos y posteriormente estos elementos lo propagaron a las enterobacterias^{167,192,193} (Fig. 5A). Se han aislado distintas variantes del transposón Tn1999¹⁹¹ (Fig. 5B). Tn1999.1, consiste en dos copias de la secuencia de inserción IS1999; una copia se inserta 26 pares de bases aguas arriba de *bla*_{OXA-48} y otra copia se inserta aguas abajo de *bla*_{OXA-48}. Adicionalmente, las versiones Tn1999.1, Tn1999.2 y Tn1999.3 incluyen el gen completo de *lysR*, un regulador transcripcional que también se encuentra en el cromosoma de *Shewanella* spp.¹⁹³. Tn1999.2 y Tn1999.3 contienen una inserción IS1R en IS1999 aguas arriba de *bla*_{OXA-48} creando un promotor híbrido (caja -35 de IS1R y caja -10 de IS1999) que promueve una mayor actividad enzimática en comparación con otros Tn1999¹⁷⁴. Tn1999.3 difiere de Tn1999.2, con una segunda copia de IS1R localizada justo aguas abajo de *bla*_{OXA-48}. Tn1999.4 es una variante de Tn1999.2 y lleva una inserción del Tn2015 que afecta el gen de *lysR* e incluye *ISEcp1* con el gen ESBL *bla*_{CTX-M-15}. Otra versión del Tn1999.2 es la versión Tn1999.5, en la cual el *lysR* está truncado por la *ISKpn19*¹⁹⁴ o la versión invertida del transposón Tn1999.2 aislada en plásmidos presentes en múltiples especies¹⁹⁵. Recientemente, se han descrito otras variantes como el Tn1999.6¹⁹⁶ o el Tn1999.7¹⁹⁷, las cuales presentan otros genes como resolvasas o endonucleasas. Los plásmidos que albergan las variantes Tn1999 asociadas al gen *bla*_{OXA-48} pertenecen a los tipos de replicones incl^{198,199}. Los plásmidos incl forman una de las principales familias de plásmidos en enterobacterias^{73,200}. En los plásmidos pOXA-48 no es común aislar otros genes AMR adicionales al gen *bla*_{OXA-48}^{191,194,200,201}. Los plásmidos que

comúnmente albergan el Tn1999.2 o el Tn1999.4 se aíslan habitualmente en plásmidos de aproximadamente 70 kb y son capaces de replicar en una amplia gama de especies de enterobacterias²⁰². Estos plásmidos se conocen habitualmente como plásmidos pOXA-48a-like y son altamente transmisibles al tener una alta capacidad de conjugación²⁰³.

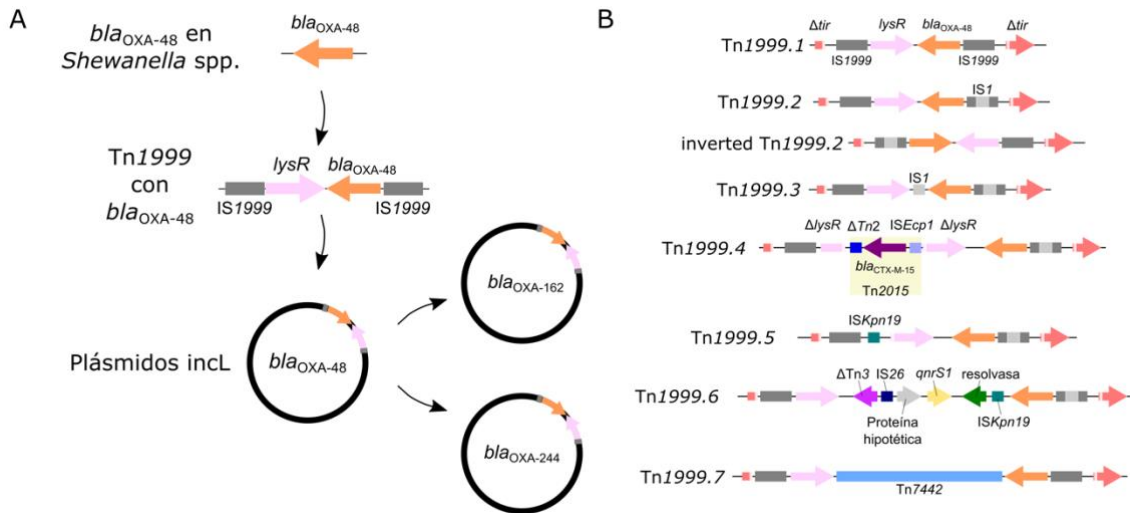


FIGURA 5. Contexto genético de las carbapenemasas tipo OXA-48.

A) Representación no a escala de los entornos genéticos del gen *bla*_{OXA-48}. B) Versiones del Tn1999 en plásmidos pOXA-48a-like. Imagen sin escalar.

5.7 Barreras a la diseminación de los plásmidos

Los plásmidos son elementos comunes en la biología de las bacterias y juegan un papel clave en la propagación y evolución de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos^{45,61,64,66,71,74-76,81}. En condiciones selectivas para los genes presentes en plásmidos, como en los tratamientos con antibióticos, los plásmidos pueden ser muy beneficiosos para sus huéspedes, aportando a las bacterias que los llevan una ventaja adaptativa respecto a sus homólogas libres de plásmidos²⁰⁴. Sin embargo, existen varias evidencias que hacen difícil entender el mantenimiento de los plásmidos en las comunidades bacterianas a largo plazo²⁰⁵⁻²⁰⁷. Los plásmidos pueden representar una carga metabólica extra a las células, lo que en ocasiones se traduce en una reducida tasa de división²⁰⁸. Esta reducción es conocida en inglés como *fitness cost* (Fig. 6). Dado que en castellano no existe una traducción exacta de los términos *fitness* y *fitness cost* aplicados a la biología evolutiva, en esta tesis utilizaré los términos *coste* en el *fitness* bacteriano para describir este fenómeno.

Los costes en el *fitness* bacteriano impuestos por los plásmidos desempeñan un papel clave en la ecología y la evolución de las comunidades bacterianas. Los costes en el *fitness* bacteriano impuestos por los plásmidos generan una selección directa en contra las células portadoras de plásmidos. De tal modo que, el coste impuesto por los plásmidos podría hacer que, a la larga y especialmente en condiciones no selectivas para los plásmidos, las bacterias libres de plásmidos acabarían superando por competencia a sus homólogas con plásmidos. Además, este fenómeno podría acelerarse por una posible pérdida de plásmidos durante la división celular bacteriana, pese que muchos plásmidos tienen sistemas activos de partición^{209,210}. Para evitar la pérdida durante la segregación celular, algunos plásmidos llevan sistemas toxina-antitoxina que garantizan su estabilidad en las células^{211,212}. Estos sistemas se basan en un conjunto genes que codifican una proteína tóxica (toxina) y su neutralizante correspondiente (antitoxina). La antitoxina es menos estable que la toxina, por lo que, si el plásmido se pierde durante la división celular, la toxina elimina a la nueva célula, asegurando que durante la división celular el plásmido se herede a las células descendientes por transmisión vertical. No obstante, los sistemas toxina-antitoxina no son garantía de la supervivencia del plásmido a largo plazo debido a la posibilidad de que los genes de la antitoxina puedan ser movilizados al cromosoma, lo que permitiría la pérdida de plásmidos de las células sin sufrir los efectos de la toxina^{213,214}. Este mismo fenómeno también se podría aplicar al resto de los genes plasmídicos incluso cuando son beneficiosos, siendo capturados en el cromosoma y permitiendo así la pérdida de la estructura redundante del plásmido. Además, muchas bacterias han desarrollado un amplio abanico de sistemas que contrarrestan la presencia de plásmidos, como el sistema DdmABC y DdmDE de *Vibrio cholerae*²¹⁵ o sistemas basados en CRISPR-Cas²¹⁶ entre otros^{217,218}.

Todas estas evidencias hacen difícil entender la gran abundancia y ubiquidad de los plásmidos en las comunidades bacterianas^{66,219,220}. A este enigma se lo conoce como la paradoja de los plásmidos²²¹.

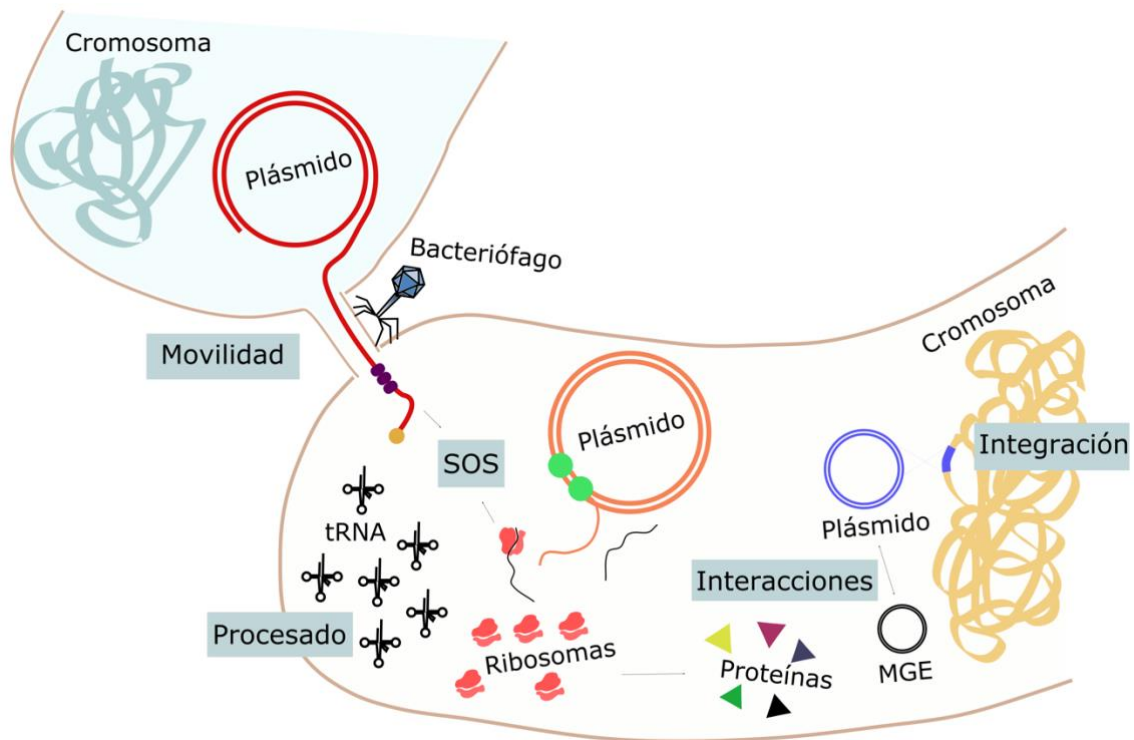


Figura 6. El origen del coste en el fitness bacteriano producido por los plásmidos en sus hospedadores.

La conjugación es un proceso energéticamente costoso para la célula, ya que requiere una gran demanda energética en forma de adenosín trifosfato (ATP) para la formación del canal de acoplamiento y la translocación del DNA del plásmido^{222,223}. También, los plásmidos que entran por conjugación⁷⁷ a una nueva célula lo hacen como DNA de cadena simple²²⁴. Esto produce una activación transitoria de la respuesta SOS bacteriana²²⁵ que puede reducir la tasa de duplicación de la célula hospedadora²⁶. Curiosamente, algunos plásmidos conjugativos contienen genes anti-SOS, como el *psiB*²²⁶. Por otro lado, muchos plásmidos contienen otros MGE⁶⁸ y pueden integrarse en el cromosoma del huésped²²⁷⁻²²⁹, lo que en algunos casos puede producir efectos deletéreos para la bacteria. No obstante, se cree que la principal carga asociada al coste de los plásmidos es la interacción de las proteínas codificadas en el plásmido con las redes celulares de la bacteria hospedadora²³⁰⁻²³³. Figura modificada de San Millán *et al.*²³⁴.

A pesar de que los costes de los plásmidos son teóricamente una importante limitación para la supervivencia de los plásmidos en las poblaciones bacterianas, se han descrito varias condiciones ecológicas y evolutivas que ayudan a entender la alta prevalencia de los plásmidos en dichas poblaciones (resumidas en la Fig. 7)²²⁰:

- (1) Transmisión infecciosa: Varios estudios muestran como las altas tasas de HGT pueden explicar la subsistencia de estos elementos en las comunidades bacterianas, incluso cuando los plásmidos imponen altos costes en el *fitness* bacteriano^{205,207,235-237}. También se ha observado que,

en determinadas condiciones como durante regímenes periódicos de selección, bajas tasas de HGT pueden ser suficientes como para asegurar la supervivencia de los plásmidos a nivel poblacional²³⁸.

- (2) Efecto fuente-sumidero: en comunidades bacterianas donde conviven miembros con distinta capacidad de hospedar plásmidos, estos pueden mantenerse a nivel de comunidad por un efecto conocido como transmisión fuente-sumidero²³⁹ (del inglés *source-sink dynamics*). En este escenario, los plásmidos persisten en especies poco "amigables" para los plásmidos llamadas bacterias "sumidero" que, de otro modo serían incapaces de mantenerlos debido a la transmisión derivada de la presencia de otras especies hospedadoras más competentes llamadas "fuente" que actúan como reservorio. Además, el flujo constante de plásmidos a especies "sumidero" podría aumentar la probabilidad de que los plásmidos, las bacterias o ambas se adapten para una mejor convivencia²⁴⁰.
- (3) Interacciones con otros MGE: es común encontrar distintos plásmidos conviviendo en una misma célula y se ha visto que su interacción también puede afectar las dinámicas de los plásmidos en las poblaciones bacterianas. La interacción con otros MGE puede afectar a los plásmidos vía inserción y disrupción de genes^{213,241,242}. También, se ha visto que la presencia de bacteriófagos líticos puede limitar la disponibilidad de bacterias hospedadoras de plásmidos²⁴³. Además, algunos plásmidos no son auto-transferibles⁶⁷ y dependen de otros MGE presentes en la célula para transferirse. Desde el punto de vista del *fitness* bacteriano, la presencia de otros plásmidos dentro de la misma célula puede conducir a efectos de epistasis sinérgica en los costes asociados a los plásmidos, donde la coexistencia de distintos plásmidos en una misma célula produce menores costes durante la coinfección, en comparación con los costes esperados de cada plásmido por separado^{244,245}. Este efecto ayuda a entender por qué los genomas bacterianos contienen múltiples plásmidos con más frecuencia de lo que se espera por azar.

(4) Evolución compensatoria: un elemento clave que contribuye a explicar la persistencia de los plásmidos en las comunidades bacterianas es la aparición de mutaciones compensatorias que reduzcan el coste de los plásmidos²³⁴. Se ha demostrado que las mutaciones compensatorias pueden aparecer en ambientes con y sin selección^{244,246}. Esto sugiere que incluso cuando los genes plasmídicos son beneficiosos para la célula, la compensación del coste es necesaria para evitar una posible pérdida o captura por el cromosoma. No obstante, se ha observado que durante regímenes de selección positiva se incrementa el número de células con plásmidos, lo que favorece la aparición de dichas mutaciones²⁴⁷. Las mutaciones compensatorias pueden aparecer en el plásmido^{242,248}, en el cromosoma bacteriano^{246,247,249} o en ambos^{213,250}. Un estudio detectó mutaciones compensatorias del coste plasmídico localizadas en plásmidos afectando las proteínas de replicación²¹³. En otros casos se ha visto como las mutaciones compensatorias pueden afectar diversos genes accesorios del plásmido mediante deleciones^{242,251,252}. Muchas de estas deleciones suelen afectar a genes asociados a la conjugación^{241,242}, la cual es un proceso costoso energéticamente para la célula^{222,223,253,254}. Esto sugiere un conflicto de equilibrio entre la transferencia vertical y horizontal de plásmidos²⁴². Centrándose en las mutaciones compensatorias localizadas en el cromosoma, muchas afectan a genes metabólicos y zonas reguladoras^{241,255}. Por ejemplo, en un estudio se detectaron mutaciones en las helicasas y en la subunidad β de la RNA-polimerasa (*rpoB*), que permitieron compensar el coste del plásmido RP4 además de incrementar la aceptación de esa bacteria a otros plásmidos²⁴⁰. Teóricamente las mutaciones compensatorias en plásmidos deberían ser más comunes ya que deberían reducir los costes del plásmido también en las futuras células receptoras²⁵⁶. Sin embargo, las mutaciones compensatorias de los costes plasmídicos localizadas en el cromosoma son más comunes en los estudios hasta la fecha. Este fenómeno podría explicarse por la exposición a distintas fuerzas selectivas que podrían determinar el éxito de esas mutaciones. Por ejemplo, un estudio evidenció cómo el efecto en el

fitness bacteriano de algunos plásmidos, como el R6K o el RP4, es distinto a corto y a largo plazo en una misma bacteria²⁵⁷ y otro evidenció como el coste del plásmido pOXA-48 variaba de negativo a positivo en distintas cepas clínicas de *E. coli* y *K. pneumoniae*²⁵⁸. Además, los plásmidos suelen contener más de una copia⁶⁶ y se ha demostrado que factores como la dominancia entre los alelos que coexisten dentro de la misma célula determina que genes son transferidos por HGT²⁵⁹.

- (5) Diferentes hospedadores: la mayoría de modelos de persistencia de plásmidos suelen asumir que las propiedades de los plásmidos son inherentes a los mismos. Sin embargo, las propiedades que determinan la persistencia del plásmido podrían variar entre hospedadores. Se ha visto como la segregación del plásmido²⁶⁰, los efectos en el *fitness* bacteriano^{258,261,262} y las tasas de conjugación^{263–265} varían ampliamente entre los entornos genéticos. No obstante, las causas moleculares de esta variación en las propiedades de los plásmidos se desconocen en gran medida.
- (6) Otras adaptaciones: otras mutaciones cromosómicas no relacionadas con la reducción de los costes del plásmido, pero con una mejora global del *fitness* bacteriano, también pueden ayudar a entender la existencia de los plásmidos en las poblaciones bacterianas²⁶⁶.

Así pues, el efecto en las dinámicas evolutivas de los plásmidos asociado a sus costes, la segregación plasmídica y las tasas de transferencia, se diversifica en comunidades microbianas complejas, donde existe una mayor variabilidad genética y diversas fuerzas selectivas. No obstante, muchos de los datos de los que disponemos se basan en modelos *in vitro* o estudios basados en modelos teóricos que nos ayudan a entender las dinámicas evolutivas y de diseminación de los plásmidos en poblaciones bacterianas²⁶⁷. Estos modelos son de gran utilidad, pero tienen la limitación de no poder incluir todas las características ecológicas y evolutivas que entran en juego en las poblaciones bacterianas naturales.

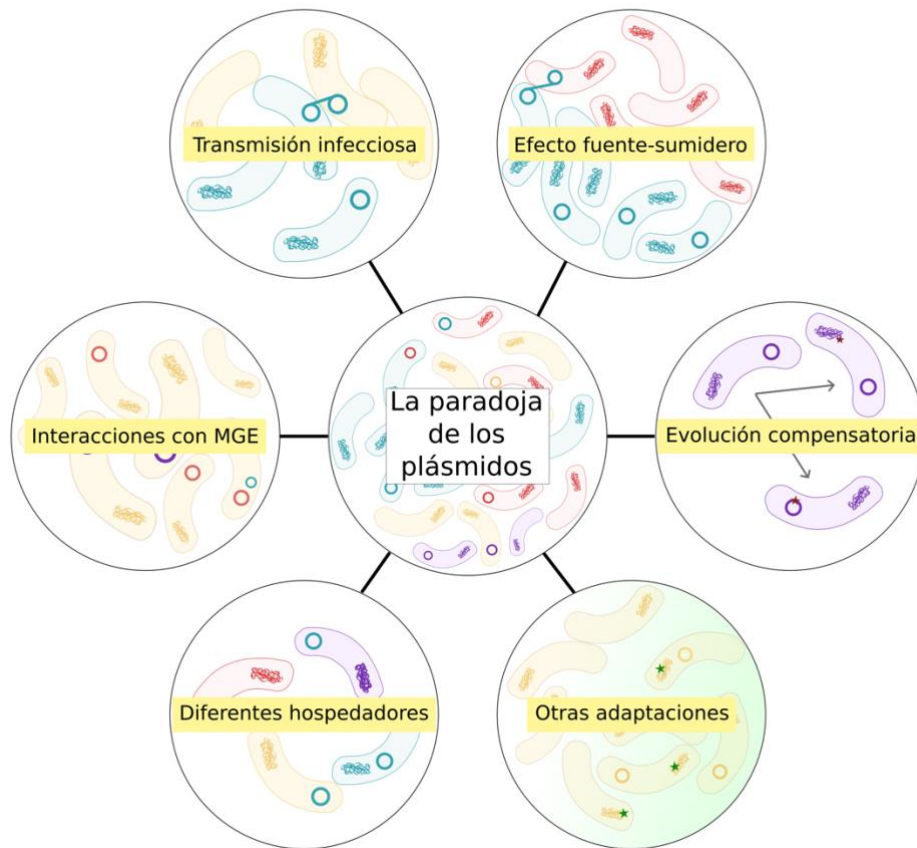


FIGURA 7. Mecanismos evolutivos y ecológicos que explican la estabilidad de los plásmidos en las poblaciones bacterianas.

Las células del mismo color pertenecen al mismo linaje, mientras que las de distinto color pertenecen a un linaje distinto. Los plásmidos se muestran como anillos, y al conectar con las células, se denota una transferencia conjugativa. Las estrellas indican mutaciones y las flechas indican cambios evolutivos. Figura modificada de Brockhurst y Harrison²²⁰.

6 Justificación y objetivos

La crisis sanitaria provocada por las resistencias a antimicrobianos (AMR) es uno de los problemas de salud pública más importantes a los que nos enfrentamos en la actualidad^{46,52}. En este ámbito, los plásmidos conjugativos son un elemento clave en la evolución⁶⁶ y la diseminación de genes AMR⁶¹ ya que permiten a las bacterias intercambiar genes mediante HGT⁵⁷.

La mayoría de los estudios que analizan la AMR mediada por plásmidos describen la prevalencia de los genes de resistencia en los aislados bacterianos detectados en un momento y lugar determinado. Estos estudios son fundamentales para entender la amenaza que representan las bacterias AMR ya que permiten controlar la aparición de brotes nosocomiales, aplicar tratamientos eficaces a pacientes portadores de bacterias resistentes y entender la epidemiología de las mismas. Estos proyectos permiten detectar las asociaciones exitosas entre plásmidos y clones bacterianos. Un buen ejemplo de éstas son las asociaciones entre las enterobacterias y los plásmidos pOXA-48, los cuales contienen genes de resistencia a antibióticos carbapenémicos. Estas asociaciones son de especial relevancia ya que se han diseminado globalmente¹⁶⁷ y son resistentes a los antibióticos carbapenémicos, los cuales se utilizan en muchos casos como última opción terapéutica a las infecciones por bacterias resistentes. No obstante, los procesos que determinan el establecimiento y la evolución de dichas asociaciones no están tan claros. Complementariamente, muchos trabajos de biología evolutiva se han centrado en comprender las dinámicas evolutivas que contribuyen al éxito de determinadas asociaciones plásmido-bacteria²²⁰. Esto, ha permitido entender que factores ecológicos y evolutivos son determinantes en la aparición y estabilización de los plásmidos en las comunidades bacterianas. A pesar de la relevancia de estos estudios, la mayoría están limitados por la utilización de modelos experimentales en los que los clones y plásmidos no son ecológicamente relevantes. Además, las asociaciones estudiadas han sido creadas en condiciones de laboratorio, muy diferentes a las que se encuentran las bacterias en ecosistemas reales como el intestino humano, el cual es un importante ecosistema bacteriano de relevancia clínica^{63,128}.

En este contexto, entender las bases evolutivas del éxito de los plásmidos pOXA-48 en las enterobacterias es el principal objetivo de esta tesis doctoral.

7 Materiales y métodos

En esta tesis se ha trabajado con varias cepas bacterianas de origen clínico (Tabla Anexo 1). En la Tabla 1, se puede ver una lista de todos los cebadores utilizados a lo largo de esta tesis doctoral y en la Tabla 2 un listado de todos los plásmidos de origen sintético. A su vez, se han usado distintas técnicas de microbiología clásica, biología evolutiva, biología sintética y análisis bioinformático. La información específica sobre materiales y métodos están descritas en detalle en los apartados de métodos específicos para cada capítulo (ver apartados: 8.1.3 y 8.2.3).

Tabla 1. Descripción de cebadores utilizados a lo largo del trabajo.

En la tabla se indica el nombre de los cebadores, su secuencia, el uso, el tamaño, las condiciones y la referencia. *Condiciones de PCR donde se usó una Taq polimerasa (2x PCRBIO Taq Mix Red, PCR Biosystems) con una concentración final de cebadores 0,2 µM. ** Condiciones de PCR donde se usó una polimerasa tipo *Phusion* (Phusion Hotstart II High-fidelity, Thermo Scientific) con una concentración final de cebadores 0,1 µM. *** Procedimiento para clonar por la metodología *Golden Gate*²⁶⁸ los sgRNA en el plásmido pLC10 (ver sección 8.2.3.2). **** Condiciones de qPCR donde se usó un kit qPCR (ver sección 8.2.3.11) y una concentración final de cebadores de 1,6 µM.

Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Uso	Tamaño amplificación (bp)	Condiciones	Referencia
Oxa48-F Oxa48-R	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTGTGATGGC	Amplificar pOXA-48	744	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 55°C 15 seg; (4) 72 °C 15; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	Poirel, L. , <i>et. al.</i> ²⁶⁹ Carattoli, A., <i>et. al.</i> ²⁰⁰
repA-F repA-R	GACATTGAGTCAGTAGAAGG CGTGCACTTCGTCTTTTCGGC	Amplificar pOXA-48	925	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 55°C 15 seg; (4) 72 °C 15; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	Carattoli, A., <i>et. al.</i> ²⁰⁰
incL-F incL/M-R	CGGAACCGACATGTGCCTACT GAACTCCGGCGAAAGACCTTC	Amplificar pOXA-48 / Detectar PV-K	852	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 55°C 15 seg; (4) 72 °C 15; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	Carattoli, A., <i>et. al.</i> ²⁰⁰
PV1-F PV1-R	GCTGGTCATGATCTACATGC GAATGCCTCGCATGTTTCATG	Detectar PV1/PV2/PV-E	708	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 55°C 15 seg; (4) 72 °C paso 15 seg ; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero <i>et. al.</i> ²⁷⁰ DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
PV2-F PV2-R	GGATCAGGAAGGCACTGGAC CGCATCTCTGCTGACGTGT	Detectar SNP PV2	427	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 59°C 15 seg; (4) 72 °C paso 8 seg ; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero <i>et. al.</i> ²⁷⁰
PV3-F PV3-R	GCGGCCTTATACCCTTATGAG GCCTACCCAGCCGGATTG	Detectar SNP PV3	582	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 61°C 15 seg; (4) 72 °C paso 9 seg ; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero <i>et. al.</i> ²⁷⁰

PV4-F PV4-R	GTCCGGTGAGTACCATAGCG CGCAAAGTCAGCGCCTCG	Detectar SNP PV4	336	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 60°C 15 seg; (4) 72 °C paso 6 seg ; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero <i>et. al.</i> ²⁷⁰
PVA-F PVA-R	GCCCCGGCATCCAACGCCATT CTGATTTGCTCCGTGGCCG	Detectar PV-A	724	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 61°C 15 seg; (4) 72 °C paso 13 seg ; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
IS1-F IS1-R	CAGTCATGGTGCTGTACTGG GAGCACTTCTTTGTGATGGC	Detectar PV-B	3207	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 63°C 15 seg; (4) 72 °C paso 1 min; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
trbN-F CTXM-R	CTGTAAATCAGCGAGTTGAG CACATTCTCTCCGTGGAT	Detectar PV-D	1099	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 56°C 15 seg; (4) 72 °C paso 17 seg; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
traC_DEL-F traC_DEL-R	GCCGACTGATAACCCGAAC CATCATCGCCGTCTCGATC	Detectar mutaciones en posición 48.500-48.853 (ref k8)	557	(1) 95°C 1 min; (2) 95°C 15 seg; (3) 58°C 15 seg; (4) 72 °C paso 8 seg; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 2 min.*	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pBGA1-F pBGA1-R	ATTGGCTGAGTTTTTTAAGGCAGTTATTGG CTGATGACATTTAGCTTCTTAGCTCC	Construir pBGA	3.445	(1) 98°C 30 seg; (2) 98°C 5 seg; (3) 65°C 20 seg; (4) 72 °C paso 53 seg; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 7 min.**	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pBGA2-F pBGA2-R	GGAAGCTAAAATGTCATCAGCGGTGGAG CTTAAAAAACTCAGCCAATCGACTGGC	Construir pBGA	805	(1) 98°C 30 seg; (2) 98°C 5 seg; (3) 65°C 30 seg; (4) 72 °C paso 13 seg; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 7 min.**	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pLC10sg-F pLC10sg-R	CACAGTTGTGCCCGTGACCAGCGG AAACCCGCTGGTCACGGGCACAAC	Clonar el sgRNA con el gen <i>pemK</i> en pLC10-Kan	20	Fosforilación inicial de cebadores: 30 min 37°C. Hibridación a 95°C (en termobloque) y dejar enfriar a temperatura ambiente hasta 40°C. Clonaje en termociclador: 25 ciclos de 3 min a 37°C y 4 min a 16°C. Al acabar los 25 ciclos, continuar con 5 min a 50°C y 5 min a 80°C.***	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
PCNoxa-F PCNoxa-R	GGATACTCGACTAGAACTGAA GTGGGCATATCCATATTCATG	Determinar el PCN por qPCR	200	(1) 95°C 5 min; (2) 95°C 15 seg; 55°C 30 seg; 60°C 30 seg; (3) repetir paso (2) 30 veces.****	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹

PCNdnaE-F PCNdnaE-R	GGCAAATTGATGACCAGCTT GCATCCGCCCTCTGATAGTA	Determinar el PCN por qPCR	200	(1) 95°C 5 min; (2) 95°C 15 seg; 55°C 30 seg; 60°C 30 seg; (3) repetir paso (2) 30 veces.****	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pLC10-Ap1- F pLC10-Ap1- R	TTGGCTGAGCTCAGAATTGGTTAATTGGTTGTG ATAAGCTGTCAAACCAGATCAATTCGCGCTAACTCACAT TAATTG	Construir pLC10- Apra	3.231	1) 98°C 30 seg; (2) 98°C 5 seg; (3) 62.4C 20 seg; (4) 72 °C paso 1 min; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 7 min. Muestra procedente de una extracción plasmídica del pLC10-Kan diluida 1/10 en agua.**	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pLC10-Ap2- F pLC10-Ap2- R	GATCTGGTTTGACAGCTTATCATCGACTG TCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTG	Construir pLC10- Apra	3.462	(1) 98°C 30 seg; (2) 98°C 5 seg; (3) 70°C 20 seg; (4) 72 °C paso 55 sec; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 7 min. Muestra procedente de una extracción plasmídica del pLC10-Kan diluida 1/100 en agua.**	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pLC10-Ap3- F pLC10-Ap3- R	TATTGCCACGCGCCAATGGACCAACATAATAAGGAATTC G CTGATGACATAACACCCCTTGTTACTG	Construir pLC10- Apra	3.113	(1) 98°C 30 seg; (2) 98°C 5 seg; (3) 68.4°C 20 seg; (4) 72 °C paso 1 min; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 7 min. Muestra procedente de una extracción plasmídica del pLC10-Kan diluida 1/100 en agua.**	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pLC10-Ap4- F pLC10-Ap4- R	AAGGGGTGTTATGTCATCAGCGGTGGAG CCAATTCTGAGCTCAGCCAATCGACTGG	Construir pLC10- Apra	826	(1) 98°C 30 seg; (2) 98°C 5 seg; (3) 62°C 20 seg; (4) 72 °C paso 15 seg; repetir paso (2) 34 veces; (5) 72°C 7 min. Muestra procedente de un lisado de 50 µl procedente de una colonia de <i>E. coli</i> MG1655 con el plásmido pMDIAI.**	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹

Tabla 2. Descripción de plásmidos sintéticos utilizados a lo largo del trabajo.

En la tabla 2 se indica el nombre, el uso, el tamaño (en bp, pares de bases), las características a destacar y la referencia de los plásmidos sintéticos utilizados y/o construidos en los capítulos incluidos en esta tesis.

Nombre	Uso	Tamaño (en bp)	Características destacables	Referencia
pBGC	Receptor en conjugaciones Competidor común en competiciones	4.102	No movilizable, resistente a cloranfenicol, expresión de la GFP por inducción de la arabinosa.	Alonso-del Valle, A. <i>et. al.</i> ²⁵⁸
pBGA	Receptor en conjugaciones Competidor común en competiciones	4.247	No movilizable, resistente a apramicina, expresión de la GFP por inducción de la arabinosa. Ver Fig. 15 B	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pLC10-Kan	Curar el plásmido pOXA-48 de aislados clínicos	10.562	No movilizable, resistente a kanamicina, sistema CRISPR-Cas9, origen de replicación termosensible.	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pLC10-Apra	Curar el plásmido pOXA-48 de aislados clínicos	10.552	No movilizable, resistente a apramicina, sistema CRISPR-Cas9, origen de replicación termosensible. Ver Fig. 15 A	DelaFuente <i>et. al.</i> ²⁷¹
pMDIAI	Aislar el gen de resistencia a la apramicina para su uso en: pBGA, pLC10-Apra	4.104	Movilizable y resistente a apramicina y ampicilina. Addgene #51655.	Yang, J <i>et. al.</i> ²⁷²

8 Resultados

Esta tesis doctoral se centra en entender la epidemiología y la evolución de plásmidos tipo pOXA-48 aislados de muestras de enterobacterias de pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (HURYC, Madrid, España). Esta tesis se presenta en formato de resultados, donde el primer capítulo incluye el análisis de la diseminación de la resistencia de cepas portadoras de plásmidos pOXA-48 y el segundo capítulo se centra en la evolución de los plásmidos pOXA-48.

8.1 Capítulo I: Transmisión generalizada de plásmidos tipo pOXA-48 en el intestino de pacientes hospitalizados

Este primer capítulo forma parte de un trabajo que ha sido publicado en la revista *Nature Microbiology*, ver cita²⁷⁰. Este trabajo incluye tres co-primeros autores, entre los cuales me incluyo. En esta tesis haré especial incidencia en las partes en las cuales he participado más activamente.

8.1.1 Resumen del capítulo I

Las infecciones causadas por enterobacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos en entornos clínicos son una importante amenaza sanitaria. La epidemiología de las CRE en los hospitales se basa en dos procesos: (1) la transferencia entre pacientes, donde hay una diseminación de clones específicos de CRE entre pacientes. Y (2), la transferencia intra-paciente, donde plásmidos con genes de resistencia a antibióticos carbapenémicos se transfieren entre las enterobacterias del microbioma intestinal de cada paciente. No obstante, la contribución relativa de cada proceso a la diseminación hospitalaria de la resistencia a los antibióticos carbapenémicos sigue estando poco explorada. En este capítulo, combinamos datos epidemiológicos de más de 9.000 pacientes con información de la secuencia del genoma completo de 250 clones de enterobacterias para caracterizar las rutas de diseminación de resistencia a antibióticos carbapenémicos mediada por plásmidos de la familia pOXA-48. Este apartado contiene datos de un entorno hospitalario durante un periodo de dos años. Los resultados revelan una frecuente transmisión de clones de alto riesgo, principalmente de *K. pneumoniae* y esporádicamente de *E. coli*.

Además, se identificaron puntos de diseminación de pOXA-48 en el hospital, como habitaciones individuales. Mediante el análisis de la secuencia del plásmido, descubrimos eventos de HGT de pOXA-48 dentro de los pacientes, lo que es crucial para entender la epidemiología de la resistencia mediada por el gen *bla*_{OXA-48}. Los datos obtenidos de ensayos de conjugación *in vitro*, sugieren que los plásmidos pOXA-48 se transfieren en altas tasas en el intestino de los pacientes hospitalizados.

8.1.2 Introducción del capítulo I

La resistencia a los antimicrobianos en las bacterias es uno de los retos sanitarios más importantes a los que nos enfrentamos hoy en día^{47,52}. La AMR es especialmente preocupante en entornos clínicos, donde los patógenos resistentes a los tratamientos antimicrobianos aumentan notablemente la mortalidad de los pacientes en estado crítico y los costes asociados a la gestión y el control de las infecciones^{52,273}. La propagación de los genes de resistencia a los antibióticos entre las bacterias comúnmente asociadas a las infecciones hospitalarias se debe, en muchos casos, a la HGT de plásmidos conjugativos^{63,65}. Sin embargo, la frecuencia con la que esto ocurre en el entorno clínico y su importancia para la diseminación de la resistencia a nivel local son poco conocidas. Uno de los grupos de patógenos nosocomiales más relevantes desde el punto de vista clínico es el de las CRE, capaces de producir carbapenemasas. Entre estas, los clones de *K. pneumoniae* y *E. coli* con carbapenemasas codificadas en plásmidos representan la mayor amenaza¹⁵⁷. A pesar de su relevancia clínica, siguen existiendo lagunas en nuestro conocimiento de la epidemiología de las CRE y de los plásmidos que contienen genes de carbapenemasas. Diversos estudios han destacado la importancia de la transmisión intrahospitalaria de CRE de paciente a paciente^{274,275} (transferencia entre pacientes). Sin embargo, la diseminación y evolución de los CRE en los hospitales presenta una capa adicional de complejidad: la transferencia de plásmidos que contienen genes de carbapenemasas entre clones de enterobacterias en el microbioma intestinal de pacientes (transferencia intra-paciente)^{68,168,276–278}. Comprender la importancia relativa de la transferencia entre e intra pacientes es fundamental para entender la epidemiología

de las CRE y así poder desarrollar estrategias de intervención para controlar la propagación de la resistencia a los antibióticos carbapenémicos en los entornos clínicos. Una de las carbapenemasas más frecuentes en las enterobacterias es la OXA-48¹⁶⁷. El gen *bla*_{OXA-48} suele ubicarse en plásmidos del tipo pOXA-48, los cuales se aíslan en un amplio rango de huéspedes¹⁹¹. Este tipo de plásmido se asocia con frecuencia a los clones de alto riesgo de *K. pneumoniae*^{191,201,275,279}, como los clones ST11, ST15, ST101 y ST405 que pueden propagarse fácilmente entre pacientes hospitalizados produciendo brotes nosocomiales^{280,281}. Estudios epidemiológicos previos sugieren que los plásmidos pOXA-48 se transfieren entre los miembros del microbioma intestinal de los pacientes^{282–286}, lo que sugiere que los plásmidos pOXA-48 podrían ser un sistema de estudio ideal para investigar la diseminación nosocomial de la resistencia a los antibióticos carbapenémicos. En el capítulo I, nos centramos en examinar la dinámica de transferencia de pOXA-48 entre y dentro de los pacientes hospitalizados. Para el análisis, utilizamos una colección de enterobacterias portadoras de pOXA-48 aisladas en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y previamente aislada como parte del proyecto europeo R-GNOSIS (*Resistance of Gram-Negative Organisms: Studying Intervention Strategies*)^{172,287}. Combinando datos epidemiológicos de más de 9.000 pacientes con la información de la secuencia genómica de 250 clones de enterobacterias y ensayos fenotípicos, definimos las dinámicas de la transferencia de clones portadores del plásmido pOXA-48 en pacientes hospitalizados.

8.1.3 Métodos específicos del capítulo I

8.1.3.1 Diseño del estudio y colección de muestras

Se estudiaron muestras recogidas de pacientes ingresados en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, España) desde marzo de 2014 hasta marzo de 2016, como parte de un programa de vigilancia para la detección de pacientes portadores de ESBL/carbapenemasas (R-GNOSIS-FP7-HEALTH-F3-2011-282512)^{172,286–288}. El programa fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Ramón y Cajal (código de referencia 251/13). Se utilizó un código de tres letras generado aleatoriamente para proteger el anonimato de los pacientes. El cribado incluyó un total de 28.089 muestras de 9.275 pacientes ingresados en 4 servicios hospitalarios distintos (gastroenterología,

neurocirugía, neumología y urología) en el Hospital Universitario Ramón y Cajal. Las muestras rectales se obtuvieron de los pacientes en las 72 horas siguientes al ingreso y se obtuvieron muestras semanales adicionales de los pacientes hospitalizados ≥ 7 días. También, se obtuvo una muestra final en el alta de los pacientes con una estancia hospitalaria ≥ 3 días. Este protocolo permitió obtener una secuencia temporal para cada paciente en el hospital. En este capítulo nos hemos centrado en el subconjunto de pacientes colonizados por enterobacterias portadoras de plásmidos pOXA-48 dentro del proyecto R-GNOSIS. Más información sobre los pacientes colonizados por enterobacterias portadoras de pOXA-48 en el hospital, así como información sobre otras CRE aisladas en el marco del estudio R-GNOSIS, puede encontrarse en las citas^{172,286,288}. De manera complementaria, para caracterizar mejor la diversidad y la diseminación de pOXA-48, incluimos en el análisis de transferencia de pOXA-48 dentro del paciente todas las enterobacterias portadoras de pOXA-48 aisladas de pacientes en el hospital desde que el plásmido se identificó por primera vez en 2012. En concreto, incluimos 79 enterobacterias portadoras de pOXA-48 adicionales no incluidas en el proyecto R-GNOSIS (Todas las cepas están incluidas en Tabla Anexo 1, para más información ver Tabla Suplementaria 1 en León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero *et. al.*²⁷⁰).

8.1.3.2 Caracterización bacteriana

Las muestras se caracterizaron inicialmente como parte del protocolo de R-GNOSIS¹⁷². Brevemente, los hisopos se sembraron en medios de agar selectivo Chromo ID-ESBL y cromogénico Chrom-CARB/OXA-48 (BioMérieux) y las colonias bacterianas capaces de crecer en estos medios se identificaron mediante espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF, Bruker Daltonics). De cada muestra se recuperó un aislado por especie identificada en agar cromogénico. La producción de OXA-48 se confirmó con la prueba KPC/MBL/OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica). Se utilizó el sistema automatizado MicroScan (Beckman Coulter) para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y los resultados se interpretaron según las directrices de EUCAST (EUCAST breakpoint v.7.1). Además, los genes de resistencia similares a *bla*_{OXA-48} se identificaron inicialmente mediante PCR multiplex. Los plásmidos tipo pOXA-48 se detectaron mediante ensayos de PCR dirigidos al gen de iniciación de la replicación *repC* y al gen *bla*_{OXA-48} utilizando cebadores descritos en las citas^{173,200} y en la

Tabla 1. Ambos conjuntos de cebadores amplificarían variantes de *bla*_{OXA-48}, pero la posterior secuenciación del genoma confirmó que la variante *bla*_{OXA-48} estaba presente en todos los casos. Todos los aislados con resultados positivos para esas PCR se clasificaron como enterobacterias portadoras de pOXA-48 y sus genomas se secuenciaron posteriormente.

8.1.3.3 Cultivo bacteriano, extracción de DNA y secuenciación

Todas las enterobacterias aisladas portadoras de pOXA-48, incluyendo las de R-GNOSIS y las caracterizadas por el servicio de microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal (n=250, Tabla Anexo 1) se cultivaron en medio LB a 37 °C. El DNA genómico de todas las cepas se aisló utilizando el kit de purificación de DNA genómico Wizard (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación del genoma completo se llevó a cabo en el Wellcome Trust Centre for Human Genetics (Oxford, Reino Unido), utilizando la plataforma Illumina HiSeq4000 con lecturas de 125 pares de bases para todos los aislados. En todos los casos, los datos de secuenciación presentaron una cobertura de secuencia media superior a 100x a lo largo del genoma. Además, dos aislados de *K. pneumoniae* (K8, portador de la variante plasmídica más abundante en el hospital durante este periodo y K165), y seis plásmidos específicos similares a pOXA-48 (de *K. pneumoniae* K2, K187, K236-1 y K273; y de *C. freundii* CF12 y CF13, Tabla Anexo 1) fueron secuenciados utilizando la plataforma de Pacific Biosciences (PacBio, The Norwegian Sequencing Centre; plataforma PacBio RSII utilizando P5-C3). La tecnología de lectura larga de PacBio se utilizó en este subconjunto de muestras para generar ensamblajes híbridos de plásmido/cromosoma para usar posteriormente en el análisis genómico como referencia. Los números de acceso en GenBank para los plásmidos pOXA-48 nombrados anteriormente son: MT441554 y MT989343-MT989349, respectivamente.

8.1.3.4 Análisis filogenético

Se utilizó Mash²⁸⁹ v.2.0 para determinar las distancias entre los genomas de *K. pneumoniae* y *E. coli* utilizando las lecturas de Illumina sin procesar, para confirmar que todos los genomas pertenecían a la misma especie (distancia $\text{mash} \leq 0.05$). Estas distancias genómicas se agruparon en árboles con mashtree²⁹⁰ v.0.33. Las secuencias del genoma central (genoma *core* en inglés, que incluye el conjunto de regiones genéticas comunes presentes en todos los aislados) de los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* portadores de pOXA-48 se usaron para estudiar su diversidad y comprender la distribución de los diferentes clones entre los pacientes. Se utilizó la herramienta Snippy v.2.5 para la caracterización de variantes y la función *snippy-core* para determinar el genoma central para cada especie. Las secuencias del genoma utilizadas como referencia fueron *K. pneumoniae* K8 y *E. coli* C728 (Tabla Anexo 1). Se utilizó Gubbins²⁹¹ para detectar regiones recombinantes y eliminarlas de los alineamientos de la secuencia del genoma completo de Snippy. Se utilizó IQ-TREE²⁹² para construir un árbol de máxima verosimilitud a partir de los alineamientos. La cepa K25 (ST11) se excluyó del análisis porque los archivos *fastq* estaban truncados. Todos los árboles se visualizaron con la herramienta iTOL²⁹³. Los grupos externos utilizados para la construcción del árbol fueron: para *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* K301 (Tabla Anexo 1), y para *E. coli*, *E. coli* TW10509 (RefSeq GCF_000190995, seleccionado como grupo externo por quedar fuera de la diversidad representada por los genomas de *E. coli* en este trabajo). Se utilizó Snippy v.2.5 para establecer la secuencia del genoma central de las variantes del plásmido pOXA-48 encontradas en la colección. El ST de siete genes, para evaluar la clonalidad de los aislados²⁹⁴, se determinó en todas las muestras utilizando la herramienta *mlst* de tipificación de secuencias multilocus (MLST).

8.1.3.5 Identificación de rutas de transmisión entre pacientes

Para rastrear las rutas de transmisión de CRE entre pacientes se usó la herramienta informática SCOTTI²⁹⁵. SCOTTI es una herramienta bioinformática que tiene en cuenta la diversidad y la evolución bacteriana dentro de los huéspedes, los huéspedes no

muestreados, las infecciones múltiples del mismo huésped y los eventos de transmisión directa e indirecta. SCOTTI se usó en los STs dominantes de *K. pneumoniae* y *E. coli* (definidos como aquellos que tenían más de cuatro aislados: *K. pneumoniae* ST11, ST15 y ST307; y *E. coli* ST10). SCOTTI combina datos epidemiológicos y genómicos: como datos de entrada para SCOTTI, se utilizaron los alineamientos del genoma (eliminando las regiones de recombinación identificadas mediante Gubbins²⁹¹), las fechas de ingreso y alta de los pacientes (incluyendo información sobre reingresos), y la fecha de aislamiento de cada bacteria portadora de pOXA-48. Para el análisis de transmisión entre pacientes se usaron las muestras de R-GNOSIS, ya que eran las únicas muestras de las que se disponían todos los datos epidemiológicos. Durante R-GNOSIS, se tomaron muestras de los pacientes periódicamente, por lo que, en el caso de muchos pacientes, se recuperó más de un aislado en un corto período de tiempo, lo que aumenta el nivel de resolución de SCOTTI.

8.1.3.6 Identificación de rutas de transmisión plasmídica intra-paciente

Para confirmar la transferencia de plásmidos dentro de los pacientes, estudiamos las variantes específicas de pOXA-48 en los diferentes aislados. Las secuencias pertenecientes al plásmido pOXA-48 se mapearon utilizando la secuencia completa de uno de los plásmidos secuenciados por PacBio como referencia (de *K. pneumoniae* K8, pOXA-48_K8; Fig. 13), y las diferentes variantes y SNPs se identificaron utilizando Snippy v.2.5. Se incluyeron las cepas aisladas durante R-GNOSIS y 79 enterobacterias portadoras de pOXA-48 adicionales aisladas y caracterizadas por el servicio de microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. En primer lugar, se analizó el grado de variación genética en el plásmido entre los 250 clones bacterianos y se compararon las variantes de pOXA-48 que compartían una región común (genoma central) de al menos 60 kb (>90% de la secuencia completa, n=219, Fig. 12 y Fig. 13). Se investigaron los casos en los que una variante del plásmido que porta un SNP rastreado está presente en diferentes clones de diferentes especies. Definimos las variantes de plásmidos rastreables como pequeños subgrupos de plásmidos pOXA-48 de la colección, con una estructura y tamaño muy similares en comparación con el pOXA-48_K8 de referencia (secuencia del plásmido

central de más de >90% de la secuencia del plásmido de referencia), pero que presentan uno o más SNPs específicos y únicos (portadores de SNPs rastreables; Fig. 12 y 13). La alta calidad y cobertura de las secuencias genómicas, permitió llevar a cabo este análisis e identificar SNPs de alta confianza en los plásmidos. Además, se confirmaron las mutaciones de los cuatro SNPs rastreables utilizados para el rastreo de plásmidos utilizando la secuenciación de Sanger (Macrogen, España). El plásmido cerrado pOXA-48 de *C. freundii* CF13 se utilizó como referencia para mostrar que no había diferencias detectables en las secuencias completas de los plásmidos similares a pOXA-48 transferidos entre los aislados encontrados en el paciente YUE.

8.1.3.7 Análisis de otros plásmidos pOXA-48 en la base de datos

Se comprobó si alguno de los SNPs usados para seguir la transmisión dentro del paciente (y nombrados como rastreables) había sido descrito previamente en plásmidos similares a pOXA-48. Para ello se descargaron todas las 275 secuencias presentes en la base de datos el 10 de noviembre de 2020, presentando $\geq 50\%$ de identidad y cobertura. Se utilizó Snippy v4.6.0 para identificar polimorfismos de secuencia usando como referencia pOXA-48_K8 (MT441554). Las mutaciones 2, 3 y 4 no se identificaron. La mutación en la variante plasmídica 1 (PV1, posición 22.416 en la referencia) se encontró en 139 secuencias. Sin embargo, 115 secuencias tienen otros SNP junto al de la posición 22.416 y, por lo tanto, representan diferentes variantes del plásmido. Los 24 plásmidos restantes son similares a la variante PV1, aunque 6 de ellos tienen tamaños distintos en comparación con nuestra referencia. Por tanto, 18 plásmidos son similares a la variante PV1 de nuestro estudio. Los códigos Genbank esos plásmidos son: CP044032.1, LR025105.1, LR025098.1, LR025091.1, CP049954.1, CP049951.1, CP049948.1, CP039962.1, CP039959.1, CP039956.1, CP039953.1, CP039950.1, CP039947.1, CP039944.1, CP039938.1, LC545849.1, CP015075.2 y CP03994.1.1). Para la representación del alineamiento de distintas secuencias de pOXA-48 (Fig. 13 B) se utilizó Easyfig v2.1²⁹⁶.

8.1.3.8 Ensayos de conjugación en distintas condiciones

Se utilizaron tres medios distintos: LB y agar LB (Conda), caldo y agar MacConkey (Oxoid y Difco, respectivamente), y sales mínimas M9 (Difco) complementadas con 20 mM de gluconato sódico (Sigma-Aldrich) y con 0,1% de hidrolizado de caseína (Difco). Para facilitar la lectura, nos referimos a este medio como medio mínimo de gluconato (MMG). Además, el MMG se complementó con 1,5% de agar bacteriológico europeo (Conda) cuando se requería MMG sólido. Para las condiciones anaeróbicas, se utilizaron bolsas comerciales de generación de atmósfera anaeróbica (GasPack EZ, BD). Se realizaron unos ensayos de conjugación iniciales para introducir las variantes del plásmido pOXA-48 en *E. coli* J53²⁹⁷ (un mutante de laboratorio de *E. coli* K-12 resistente al azida de sodio). Las cepas clínicas portadoras de pOXA-48 (donantes) y *E. coli* J53 (receptora) se estrieron de los viales congelados a -80°C (de LB suplementados con 15% de glicerol) en un medio sólido de agar LB con selección de antibióticos (ertapenem 0,5 mg/l y azida de sodio 100 mg/l, respectivamente) y se incubaron durante la noche a 37 °C. Tres colonias donantes y una colonia receptora se inocularon independientemente en 2 ml de LB en tubos de cultivo de 15 ml y se incubaron durante 1,5 h a 37 °C y 225 r.p.m. (Thermo Scientific™ MaxQ™ 8000). A continuación, los cultivos del donante y de la receptora se recogieron por centrifugación (15 min, 1.500g) y las células se volvieron a suspender en cada tubo con 300 µl de cloruro de sodio (NaCl) estéril al 0,9%. A continuación, las suspensiones se mezclaron en proporciones 1:1, y se incubaron a 37 °C durante 1,5 horas en medio LB sólido. Los transconjugantes se seleccionaron mediante la estría de la mezcla de la suspensión después de la incubación anterior. La estría se hizo en LB con ertapenem (0,5 mg/l) y azida de sodio (100 mg/l). Los transconjugantes se verificaron mediante la amplificación del gen *bla*_{OXA-48} por PCR, como se ha descrito previamente¹⁷³, y las variantes del plásmido se verificaron mediante secuenciación Sanger (ver cebadores en Tabla 1). Para los ensayos de conjugación en condiciones isogénicas, las cinco cepas diferentes de *E. coli* J53 portadoras de variantes del plásmido pOXA-48 actuaron como donantes independientes, y una versión de J53 resistente al cloranfenicol desarrollada en nuestro laboratorio se utilizó como cepa receptora (J53/pBGC)²⁵⁸. Se inocularon independientemente seis colonias de cada cepa donante y receptora en 2 ml de LB en tubos de cultivo de 15 ml y se incubaron durante la noche a 37 °C y 225 r.p.m. . Al día

siguiente, se utilizaron 50 µl de cada cultivo para inocular 5 ml de LB/MacConkey/MMG en tubos de cultivo de 50 ml. Tras 3,5 h de incubación a 37 °C y 225 r.p.m. (sin agitación en condiciones anaeróbicas), se recogieron los pellets por centrifugación (15 minutos, 1.500 g) y se volvieron a suspender las células en cada tubo con NaCl al 0,9%. A continuación, se mezclaron 50 µl de las suspensiones del donante y del receptor en una proporción de 1:1 y se sembraron en un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,45 µm (Dorsan) en paralelo en los medios de agar LB/MacConkey/MMG y se incubaron a 37 °C durante 1-2 horas. Simultáneamente, se sembraron diluciones seriadas de cada mezcla de conjugación en agar seleccionando donantes, receptores y transconjugantes como controles (carbenicilina 100 mg/l, cloranfenicol 50 mg/l y una combinación de ambos, respectivamente). Tras 1 hora de incubación a 37 °C, el contenido del filtro se suspendió en 2 ml de NaCl estéril al 0,9%, se diluyó seriadamente y se sembró en agar selectivo para donantes, receptores y transconjugantes. Las tasas de conjugación se determinaron utilizando el método de *end point*²⁹⁸.

8.1.3.9 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron en R V.3.4.2. Para cada caso se comprobó la homocedasticidad y la normalidad de los datos para cada conjunto de datos y se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, la prueba de Levene y la prueba de Bartlett. Luego, según la distribución de cada grupo de datos, se realizaron pruebas paramétricas y no paramétricas (véase en la sección de resultados para cada prueba).

8.1.4 Resultados específicos del capítulo I

8.1.4.1 Pacientes hospitalizados colonizados por CRE portadoras de pOXA-48

Durante el proyecto R-GNOSIS, se tomaron muestras periódicas para detectar la presencia de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas en el microbioma intestinal de pacientes hospitalizados (ver secciones 8.1.3.1 y 8.1.3.2). El estudio incluyó a pacientes ingresados en los servicios de

gastroenterología, neumología, neurocirugía y urología. Los detalles completos del estudio R-GNOSIS en el hospital, incluyendo la población de estudio y la caracterización inicial de las CRE, han sido publicados previamente por Hernández-García *et al.* (ver citas^{172,286}). Brevemente, desde marzo de 2014 hasta marzo de 2016, se recogieron 28.089 hisopos rectales de 9.275 pacientes, y se aislaron y caracterizaron 171 cepas de enterobacterias portadoras de plásmidos tipo pOXA-48 de 97 pacientes. Además, para ampliar la colección complementamos con más enterobacterias aisladas por el servicio de microbiología (n=79, ver secciones 8.1.3.1). En consonancia con informes anteriores¹⁶⁷, *K. pneumoniae* fue la especie portadora de pOXA-48 más frecuente (n=139, Fig. 8). Sin embargo, se detectó pOXA-48 en otras diez especies de enterobacterias, siendo *E. coli* la segunda especie portadora más frecuente (n=67, Fig. 9). Además, en varios pacientes portadores de pOXA-48 (36 de 135), se detectó la presencia de más de una especie portadora del plásmido, lo que sugiere eventos de transferencia del plásmido dentro del paciente.

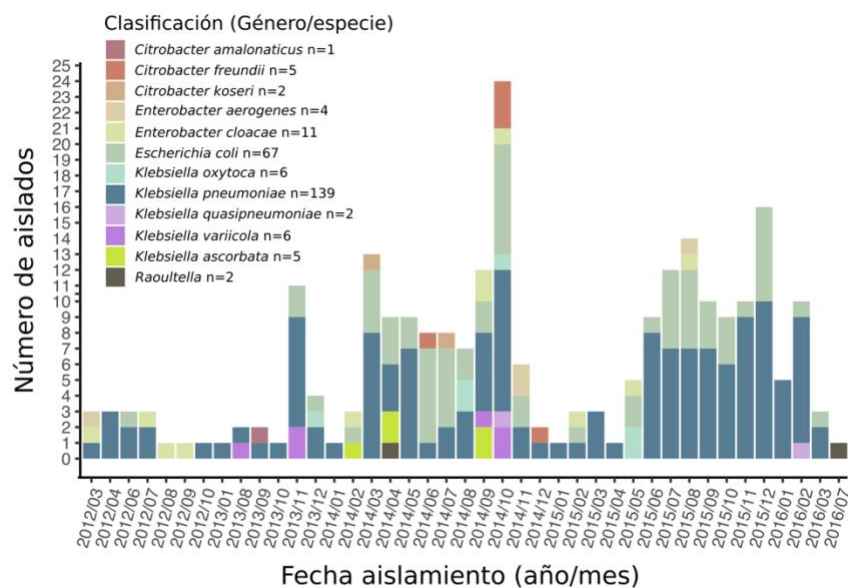


FIGURA 8. Distribución en el tiempo de los aislados de Enterobacterias portadoras de plásmidos pOXA-48 procedentes de pacientes hospitalizados.

Los aislados corresponden al período de R-GNOSIS complementados con los aislados de Enterobacterias aisladas en el servicio del hospital (ver secciones 8.1.3.1 y 8.1.3.2). El color indica la especie y el número específico de cada aislado se indica en el eje y en la leyenda. Figura modificada de León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero *et al.* 2021²⁷⁰.

A continuación, analizamos el parentesco genético de los aislados provenientes de R-GNOSIS, centrándonos en las dos especies predominantes: *K. pneumoniae* y *E. coli*. Reconstruimos la filogenia del genoma central basándonos en cada especie y en cada grupo clonal, definido por cada ST²⁹⁴ (Fig. 9 A-B). En el caso de *K. pneumoniae* (n=103), la mayoría de los aislados pertenecían a unos pocos ST de alto riesgo: ST11 (n=65), ST307 (n=17) o ST15 (n=9). Por el contrario, *E. coli* (n=45) mostró una estructura más diversa, con más de tres aislados identificados sólo para un ST, el ST10 (n=11). Además, detectamos que muchos aislados de *K. pneumoniae* pertenecían a ST presentes en más de un paciente, mientras que la mitad de los aislados de *E. coli* solo estaban presentes en un mismo paciente (Fig. 9 C). Esto sugiere que un número limitado de clones de *K. pneumoniae* son los responsables de la transmisión entre pacientes. No obstante, parece que ciertos clones de *E. coli* también podrían ser los responsables de eventos esporádicos de transferencia.

8.1.4.2 Transferencia entre pacientes de clones portadores de pOXA-48

Los datos del análisis filogenético sugieren que los principales responsables de la transferencia de la resistencia entre pacientes son clones específicos de *K. pneumoniae*. Basándonos en esa hipótesis, investigamos las rutas de diseminación de los clones portadores de pOXA-48 integrando los datos epidemiológicos y genómicos utilizando SCOTTI²⁹⁵ (ver sección 8.1.3.5). SCOTTI es una herramienta bioinformática que tiene en cuenta la diversidad y la evolución bacteriana dentro de los huéspedes, los huéspedes no muestreados, las infecciones múltiples del mismo huésped y los eventos de transmisión directa e indirecta. Analizamos la propagación de los ST dominantes de *K. pneumoniae* y *E. coli* dentro de los cuatro servicios estudiados y entre ellos. Los datos de SCOTTI revelan que los clones pertenecientes a *K. pneumoniae* ST11 fueron los responsables de la mayoría de los supuestos eventos de transmisión entre pacientes en todos los servicios e incluso entre ellos, siendo neurocirugía el servicio con mayor frecuencia y probabilidad de transmisión de ST11 (Fig. 10). Además, SCOTTI también predijo eventos de transmisión mediados por otros tres clones portadores de pOXA-48. Dos eventos de transmisión se atribuyeron a *K. pneumoniae* ST307 en el servicio de neumología y tres más a *K. pneumoniae* ST15: dos en el servicio de gastroenterología y otro entre gastroenterología y el servicio de urología. En consonancia con los resultados genómicos (Fig. 9), SCOTTI

también atribuyó dos eventos de transferencia entre pacientes a *E. coli* ST10, uno en el servicio de gastroenterología y otro entre los servicios de gastroenterología y urología (Fig. 10).

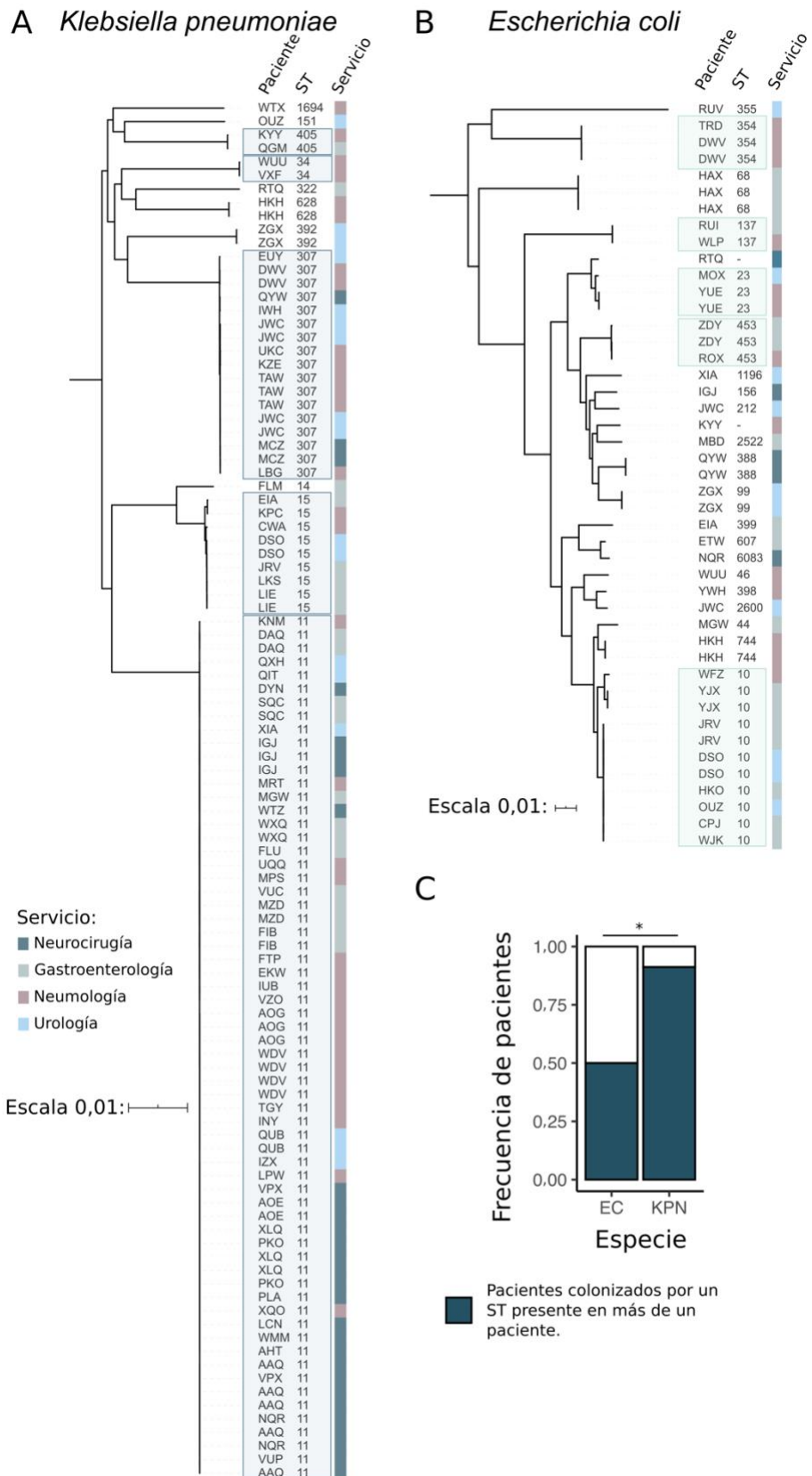


FIGURA 9. Análisis filogenético de aislados portadores de pOXA-48 en R-GNOSIS. Pertenecientes a: A) *K. pneumoniae* (n=103) y B) *E. coli* (n=45). C) Frecuencia de pacientes colonizados por *E. coli* (EC) o *K. pneumoniae* (KPN) presentes en más de un paciente.

La construcción del árbol filogenético se basa en los polimorfismos del genoma central. La escala equivale a SNPs por sitio. Las columnas a la derecha del árbol indican el código del paciente, el ST y el servicio donde se recuperó el aislado (código de color en la leyenda). Los recuadros con sombreado de color indican aislados del mismo ST de múltiples pacientes en el hospital. El asterisco indica significancia estadística en el test Chi-cuadrado, $X^2=19,167$, $df=1$, $P<0,001$. Figura modificada de León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero *et. al.* 2021²⁷⁰.

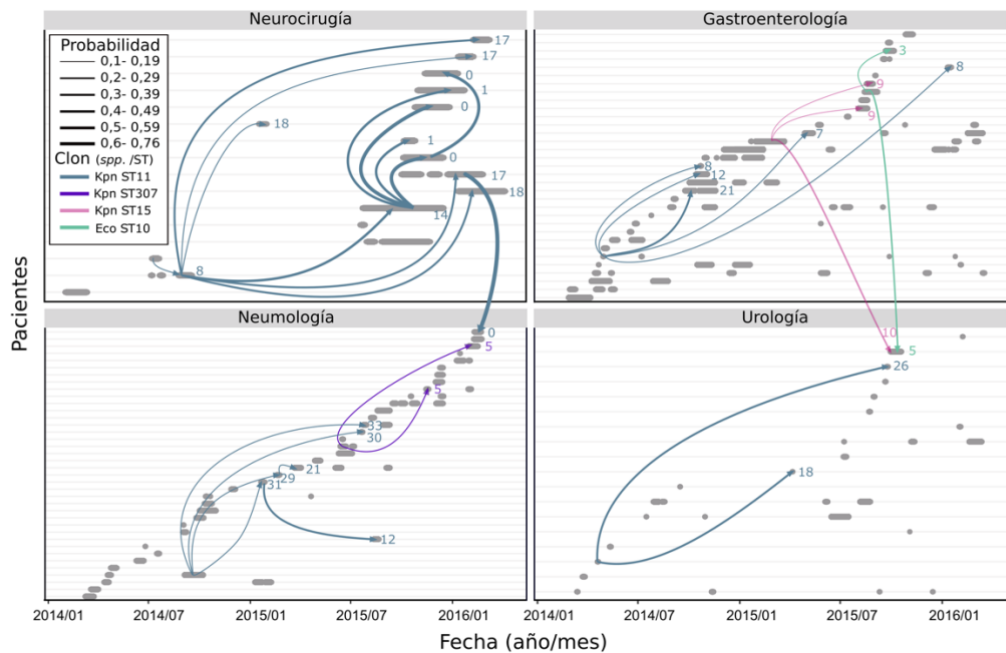


FIGURA 10. Reconstrucción de la transferencia entre pacientes de enterobacterias portadoras de pOXA-48.

Las flechas representan los eventos de transferencia entre pacientes atribuidos por SCOTTI que implican clones de enterobacterias portadoras de pOXA-48 en el hospital. Los paneles individuales representan la distribución de pacientes colonizados por enterobacterias portadoras de pOXA-48 en los distintos servicios del hospital. Cada fila representa un paciente individual, y los segmentos grises representan la duración de la estancia (desde el ingreso hasta el alta). El color de la línea indica el clon responsable del evento de transmisión, y el grosor de la línea representa la probabilidad de la transmisión atribuida por SCOTTI. En la leyenda se usa: Kpn para *K. pneumoniae* y Eco para *E. coli*. Los números a la derecha de las puntas de flecha indican el número de SNPs que diferencian el genoma central del par de clones implicados en el supuesto evento de transmisión. Nótese que los eventos de transmisión predichos por SCOTTI no son necesariamente eventos de transmisión directa entre pacientes; también pueden ser eventos de transmisión indirecta, incluyendo pacientes colonizados intermedios no observados y no muestreados o reservorios ambientales en el hospital. Figura modificada de León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero *et. al.*²⁷⁰.

A la luz de estos resultados, investigamos la epidemiología de *K. pneumoniae* ST11/pOXA-48 en el servicio de neurocirugía con más detalle, observando la distribución espacio-temporal de los pacientes colonizados. El servicio de neurocirugía incluye 10 habitaciones. De los 16 pacientes colonizados, 6 tuvieron estancias superpuestas en la misma habitación, lo que sugiere que esta habitación actuó como un punto caliente para la colonización y transmisión de *K. pneumoniae* ST11/pOXA-48 (Fig. 11).

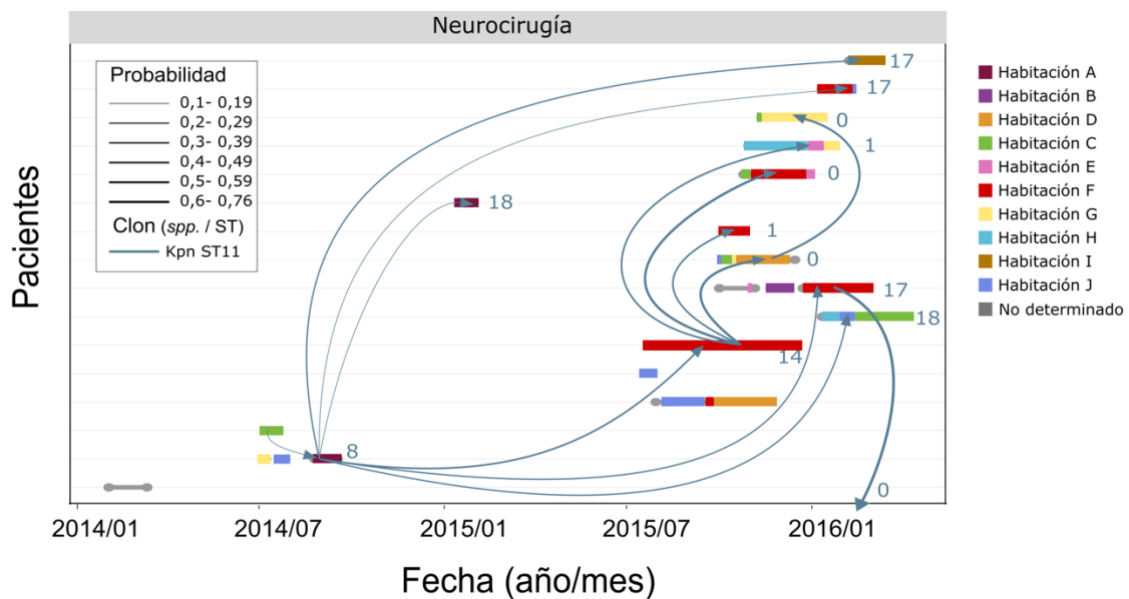


FIGURA 11. Distribución espacio-temporal de los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* ST11/pOXA-48 en la sala de neurocirugía.

Cada fila representa un paciente y los segmentos de color representan la duración de la estancia en el hospital (desde el ingreso hasta el alta). Los colores de los segmentos representan las diferentes salas dentro del servicio (véase la leyenda). Las flechas representan los eventos de transmisión previstos por SCOTTI. El grosor de la línea representa la probabilidad de la transmisión predicha por SCOTTI. El número a la derecha de la punta de la flecha indica el número de SNPs entre el genoma central del par de clones involucrados en el evento de transmisión putativo. Nótese que 6 de los 16 pacientes compartieron la habitación F en estancias superpuestas. Figura modificada de León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero *et. al.* 2021²⁷⁰.

8.1.4.3 Análisis genómico de distintas variantes del plásmido pOXA-48

La colonización de pacientes por dos especies portadoras de plásmidos sugiere eventos de HGT de pOXA-48 dentro del intestino de los pacientes. Sin embargo, existe la posibilidad de que esta observación sea el resultado de eventos de colonización independientes que involucren a diferentes clones portadores de plásmidos. Para

distinguir entre estas posibilidades, analizamos la secuencia genética de todos los plásmidos pOXA-48 de todos los aislados con el objetivo de utilizar huellas (o firmas) genéticas específicas del plásmido que nos permitieran trazar la hipotética transferencia del plásmido dentro del paciente. Para aumentar la resolución de este análisis, enriquecimos la colección R-GNOSIS recuperando y secuenciando los genomas completos de todas las enterobacterias portadoras de pOXA-48 aisladas de pacientes en nuestro hospital desde que se informó por primera vez del plásmido en 2012 (ver sección 8.1.3.1). En total, determinamos las secuencias de 250 aislados (Fig. 8) mediante secuenciación de lectura corta de Illumina. Además, se complementaron estos datos con la secuenciación de dos genomas y seis plásmidos (pOXA-48) mediante secuenciación de lectura larga para permitir el ensamblaje híbrido.

Los resultados mostraron que la secuencia de pOXA-48 está muy conservada (Fig. 12). La secuencia central del plásmido abarca más de 60 kilobases (Kb) (>90% de la secuencia del plásmido) en 219 de las 250 cepas (ver Tabla Anexo 1). El análisis del genoma central entre estos 219 plásmidos pOXA-48 reveló una secuencia idéntica en el 80% de ellos. En el 20% restante, detectamos un total de 21 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), y cada plásmido presentaba 1 o 2 SNP en comparación con la variante más común de la colección (denominada pOXA-48_K8, Fig. 12 y 13). Dada la baja variabilidad de la secuencia del plásmido, no pudimos rastrear la transmisión del plásmido usando las mismas herramientas utilizadas para la transmisión bacteriana. En lugar de ello, rastreamos la transferencia del plásmido utilizando las variantes del plásmido que llevan SNPs específicos de la región central como huellas genéticas rastreables (Fig. 12). Nos centramos en los casos en los que la misma variante del plásmido estaba presente en aislados pertenecientes a diferentes especies. Consideramos que el aislamiento de diferentes especies bacterianas portadoras de la misma variante plasmídica dentro del mismo paciente podría ser un indicador de la transferencia plasmídica dentro del paciente. Encontramos cuatro ejemplos en los que la misma variante del plásmido estaba presente en diferentes especies bacterianas (Fig. 12). Los SNPs en estas cuatro variantes del plásmido estaban localizados en *xerD*, en *traC* y en dos genes que codifican proteínas hipotéticas (Fig. 13). En los cuatro ejemplos, se aislaron diferentes especies portadoras de la misma variante plasmídica del mismo paciente (Fig. 12 B). Por ejemplo, la variante 3 del plásmido se detectó en seis aislamientos bacterianos pertenecientes a cuatro clones

(uno de *K. quasipneumoniae*, uno de *E. coli* y dos de *C. freundii*), y todos ellos se recuperaron de un único paciente del hospital (código de paciente YUE). Lo más destacable es que las probabilidades de colonización independiente del paciente con los diferentes clones bacterianos portadores de estas variantes rastreables de plásmidos son extremadamente bajas (variante 1, $1,78 \times 10^{-6}$; variante 2, $1,02 \times 10^{-3}$; variante 3, $5,63 \times 10^{-7}$; variante 4, $2,06 \times 10^{-5}$), lo que soporta la hipótesis de los eventos de transferencia de plásmidos dentro del paciente.

A continuación, examinamos la base de datos del NCBI en busca de plásmidos similares a pOXA-48. Buscamos si las mutaciones específicas usadas para rastrear los eventos de HGT estaban presentes en otras variantes de plásmidos aisladas en otros entornos. En una búsqueda realizada el 10 de noviembre de 2020, encontramos 275 plásmidos con $\geq 50\%$ de identidad y cobertura al comparar su secuencia con la de referencia (variante más común, pOXA-48_K8, Fig. 13). Las mutaciones específicas de la variante plasmídica 2 (posición en la referencia = 26.610 bp), la variante plasmídica 3 (posición en la referencia = 40.996 bp) y la variante plasmídica 4 (posición en la referencia = 50.468) no se encontraron entre las 275 secuencias. No obstante, la variante 1 no fue exclusiva de nuestra colección ya que la identificamos en 18 plásmidos de la base de datos (ver sección 8.1.3.7). Sin embargo, sólo 8 de los plásmidos pOXA-48-like aislados en nuestro hospital presentaban este perfil, por lo que consideramos que es una firma genética fiable para rastrear la transferencia de plásmidos dentro de los pacientes del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

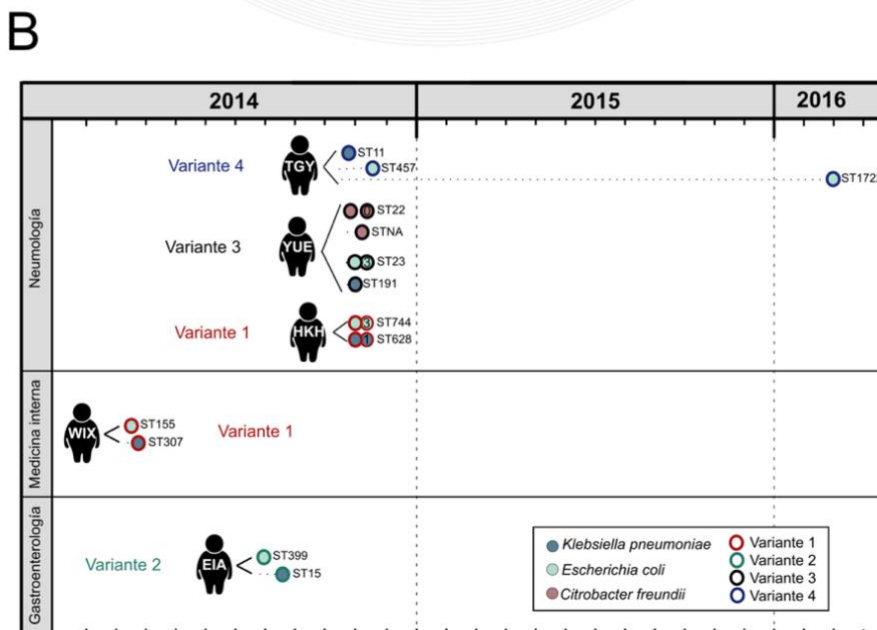
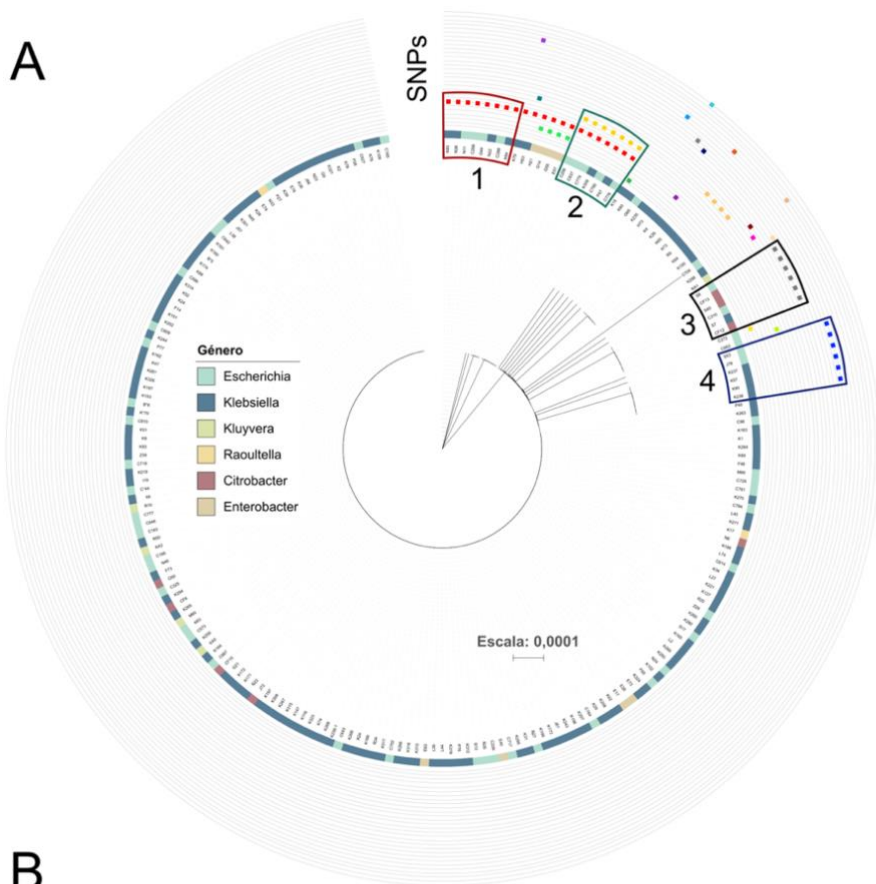


FIGURA 12. Transferencia intra-paciente de pOXA-48.

A) Dendrograma construido a partir de los polimorfismos presentes en la región de genoma central de pOXA-48. El círculo más interno indica nombres de los aislados, el segundo círculo indica el género de los aislados portadores del plásmido según el código de colores de la leyenda, y los círculos restantes indican la presencia de cada SNP del plásmido. Los recuadros de color indican las cuatro variantes del plásmido pOXA-48 (Variantes de 1-4) que portan SNP presentes en clones de diferentes especies y que se han utilizado como huellas genéticas rastreables. B) Representación de los pacientes

colonizados por clones que portan variantes rastreables del plásmido. Los pacientes están etiquetados con su el código de paciente de tres letras. Los círculos representan clones aislados del paciente, con el color de relleno indicando la especie bacteriana (ver leyenda), y la posición del círculo indicando la fecha de aislamiento. Se indica el nombre y el ST de cada aislado. Los círculos en la misma fila indican diferentes aislamientos del mismo clon; el número dentro del segundo círculo indica el número de SNPs acumulados en el genoma central bacteriano en relación con el primer aislamiento. Todos los aislamientos de cada paciente llevaban la misma mutación plasmídica rastreable, que se indica en la figura (variante y el número). Nótese que en el paciente WIX, el plásmido pOXA-48 llevaba el intrón *ltrA* del grupo II en el aislamiento N22, pero no en el N11. Curiosamente, en N11 *ltrA* está localizado en un plásmido distinto, lo que sugiere que *ltrA* puede escindirse/insertarse fácilmente entre localizaciones genómicas, lo que impide su uso como firma genética estable del plásmido. Figura modificada de León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero *et. al.* 2021²⁷⁰.

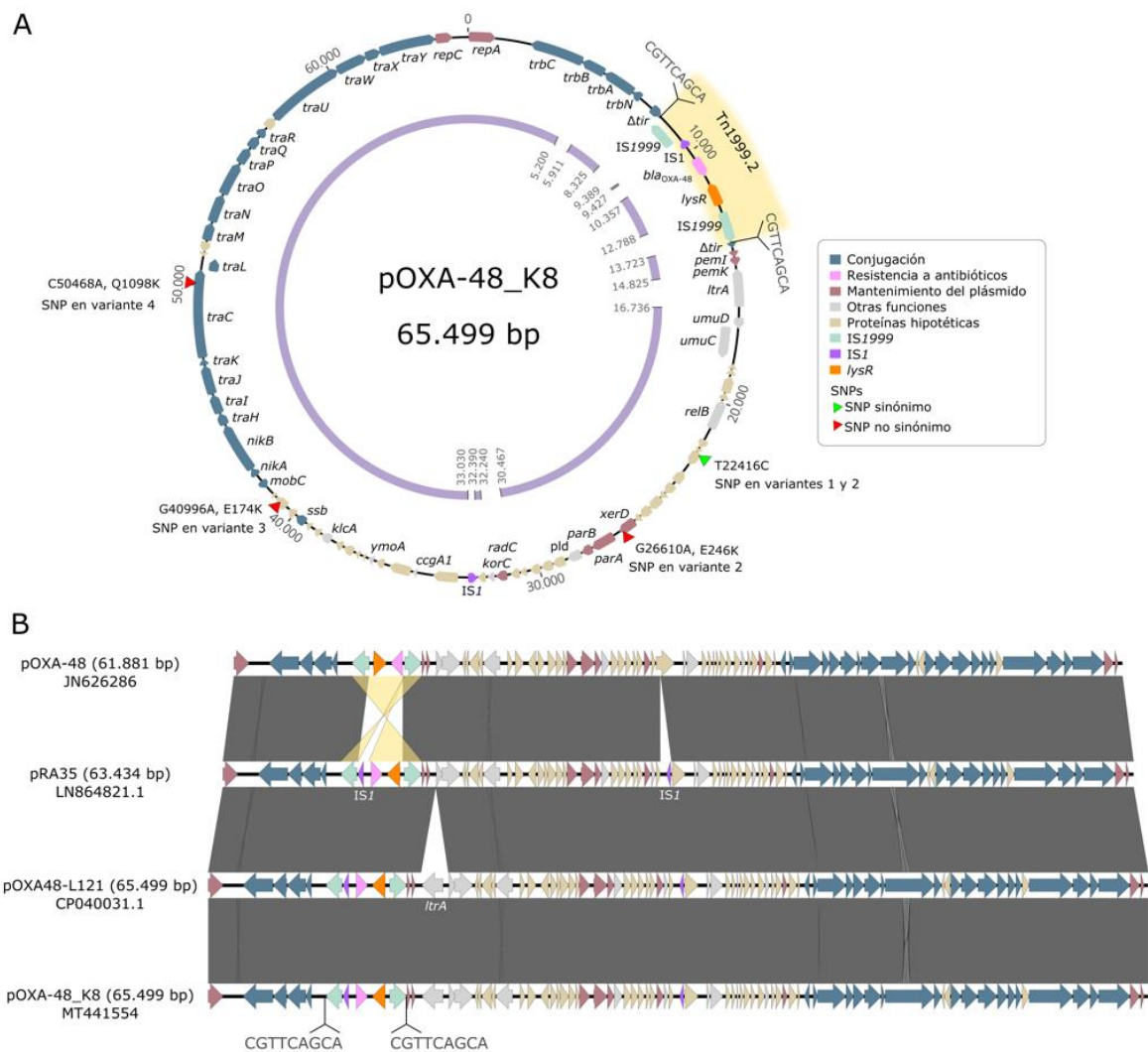


FIGURA 13. Plásmido pOXA-48.

A) Representación esquemática del plásmido pOXA-48_K8 (número de acceso GenBank MT441554). Los marcos de lectura de los genes se muestran con flechas, con la dirección

de la transcripción indicada por la punta de la flecha. Los colores de las flechas indican la clasificación funcional del gen (véase la leyenda). El gen *bla*_{OXA-48} se indica en rosa. El Tn1999.2 está resaltado en un fondo amarillo. Se indican las repeticiones directas que flanquean el Tn1999.2 (CGTTCAGCA). pOXA-48_K8 lleva un intrón del grupo II (indicado por *ltrA*) aguas abajo del gen *pemK*. Este intrón también se ha detectado en otros plásmidos similares a pOXA-48, como pOXA48-L121²⁹⁹. Las posiciones de los SNPs detectados en las variantes de pOXA-48 que se utilizaron para rastrear la transferencia dentro del paciente se indican con triángulos (verde para los SNPs sinónimos y rojo para los no sinónimos, utilizando pOXA-48_K8 como referencia). Se indica la posición de los nucleótidos mutados en el plásmido, así como los cambios aminoácidos para las mutaciones no sinónimas en las proteínas. El círculo interior de color púrpura muestra el genoma central de las variantes de pOXA-48 que compartían al menos 60 kb (>90% de la secuencia completa, n=219), que se utilizaron para investigar la transferencia del plásmido dentro del paciente (Fig. 12). Los números en el círculo interior indican la última/primer posición nucleotídica de las regiones incluidas en la secuencia central, utilizando pOXA-48_K8 como referencia. B) Comparación de las secuencias de los plásmidos pOXA-48 de la base de datos. En comparación con el pOXA-48 original¹⁷³, pOXA-48_K8 lleva la parte central de Tn1999 invertida, con una copia de IS1 insertada en IS1999, aguas arriba del gen *bla*_{OXA-48} (denominada Tn1999.2¹⁶⁷). Además, pOXA-48_K8 lleva una copia adicional de IS1 cerca del gen *korC*, que también se encuentra en el plásmido pRA35¹⁹⁵. Figura modificada de León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero *et. al.* 2021²⁷⁰.

8.1.4.4 Altas tasas de conjugación *in vitro* de pOXA-48

A pesar de las limitaciones impuestas por la sensibilidad y la frecuencia del método de muestreo, se pudieron identificar cuatro variantes rastreables de pOXA-48 que demostraron una capacidad de HGT elevada dentro de los pacientes. Estas variantes presentan SNPs en los genes *xerD*, *traC* y en dos genes que codifican proteínas hipotéticas (Fig. 13 A, Tabla Anexo 1 y Tabla Anexo 2). Sin embargo, los SNP específicos utilizados como marcas rastreables podrían estar afectando la capacidad de conjugación del plásmido, lo que dificultaría la generalización de los resultados con estas variantes a la variante pOXA-48 más común. De hecho, el SNP presente en la variante 4 del plásmido produce una mutación no sinónima en *traC*, que es un gen que podría afectar el proceso conjugativo³⁰⁰. Para descartar esta posibilidad, medimos experimentalmente las tasas de conjugación de la variante más común de pOXA-48 (pOXA-48_K8), y de las cuatro variantes rastreables, introduciendo los plásmidos independientemente en la cepa *E. coli* J53 y determinando la tasa de conjugación de cada variante en este fondo isogénico (Fig. 14 y sección 8.1.3.8). Realizamos ensayos de conjugación en tres medios de agar distintos: (1) el medio común de laboratorio caldo de lisogenia (LB), (2) MacConkey, que

contiene sales biliares, una de las principales presiones selectivas en el entorno intestinal³⁰¹, y (3) el medio mínimo M9 suplementado con gluconato (MMG), que es una fuente de carbono abundante en el intestino³⁰². Además, para asemejarse más al entorno intestinal, realizamos los experimentos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Fig. 14). Informes anteriores han demostrado que el plásmido pOXA-48 presenta altas tasas de conjugación^{191,203,282} y, en línea con estos resultados, la capacidad de conjugación *in vitro* de pOXA-48_K8 en nuestros experimentos fue alta (Fig. 14). Aunque las tasas de conjugación diferían entre los medios de cultivo (ANOVA, efecto del medio; $F=43,6$, $d.f.=2$, $P<0,001$) y la disponibilidad de oxígeno (ANOVA, efecto del oxígeno; $F=356,1$, $d.f.=1$, $P<0,001$), no variaban significativamente entre la variante más frecuente y las variantes del plásmido que llevan SNPs rastreables en las condiciones probadas (ANOVA, efecto de la variante del plásmido; $F=1,2$, $d.f.=4$, $P=0,306$). Estos resultados muestran que la variante común de pOXA-48 tiene una capacidad de conjugación similar a la de las variantes rastreables, sugiriendo que la HGT de pOXA-48 en el microbioma intestinal es probablemente la norma en los pacientes colonizados.

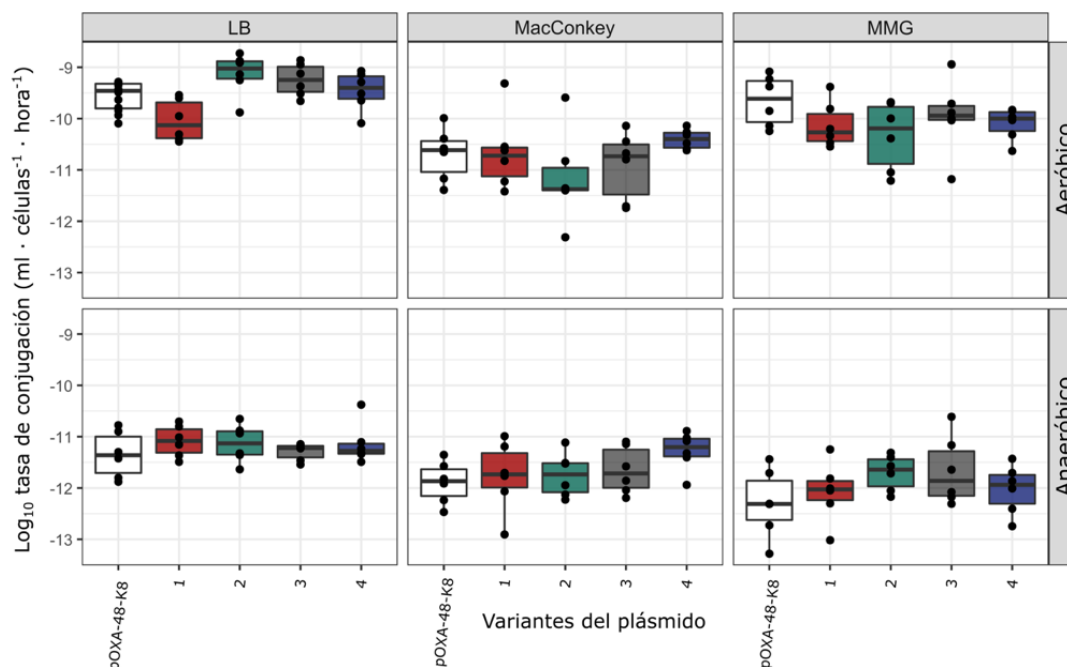


FIGURA 14. Tasa de conjugación de pOXA-48 en distintas condiciones.

Tasas de conjugación de la variante más común de pOXA-48 en el hospital (pOXA-48_K8, aislada en la cepa K8) y de las cuatro variantes utilizadas para rastrear la transferencia de plásmidos dentro de los pacientes ($n=6$ por genotipo). Los experimentos de conjugación

se realizaron en tres medios de agar diferentes: LB, MacConkey y MMG, y en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Los números de las variantes del plásmido corresponden a los indicados en las Fig. 12 y 13. Las líneas horizontales dentro de los recuadros indican los valores de la mediana, las bisagras superiores e inferiores corresponden a los percentiles 25 y 75, y los bigotes se extienden a las observaciones dentro de 1,5 del rango intercuartílico. Figura modificada de León-Sampedro, DelaFuente, Díaz-Agero *et. al.* 2021²⁷⁰.

8.2 Capítulo II: Evolución *in vivo* e intra-paciente de la resistencia a antimicrobianos mediada por el plásmido pOXA-48

El segundo capítulo de esta tesis forma parte de un trabajo publicado en la revista *Nature Ecology and Evolution*²⁷¹ del cual soy el único primer autor y autor de correspondencia.

8.2.1 Resumen del capítulo II

La resistencia a los antimicrobianos (AMR) en las bacterias es una importante amenaza para la salud pública, y uno de los elementos clave en la propagación y evolución de la AMR en los patógenos clínicos es la transferencia de plásmidos conjugativos. Los factores que impulsan la evolución de la AMR se han estudiado *in vitro*, pero el estudio de la evolución de la AMR mediada por plásmidos *in vivo* sigue sin explorarse. En este segundo capítulo, hemos seguido la evolución del plásmido pOXA-48, un plásmido de relevancia clínica y que confiere resistencia a los antibióticos carbapenémicos. Para estudiar la evolución del plásmido hemos usado una colección de clones de enterobacterias aisladas del intestino de pacientes hospitalizados. Combinando datos genómicos y experimentales, primero caracterizamos la diversidad del plásmido y los efectos genotípicos y fenotípicos de múltiples mutaciones del plásmido usando un ambiente genético común. A continuación, utilizando edición genómica en las cepas de enterobacterias aisladas de los pacientes, diseccionamos tres casos de evolución intra-paciente de la AMR mediada por pOXA-48. Los datos revelan que la evolución de la AMR mediada por pOXA-48 *in vivo* presenta una relación de equilibrio entre los niveles de resistencia y el *fitness* bacteriano. Además, capturamos eventos de evolución compensatoria del coste en el *fitness* bacteriano asociado a plásmidos, así como la

evolución de la AMR mediada por pOXA-48 en bacterias que evolucionan dentro del intestino de pacientes hospitalizados.

8.2.2 Introducción del capítulo II

La resistencia a los antimicrobianos en las bacterias se ha convertido en una importante amenaza mundial para la salud pública^{47,52}. La AMR es especialmente preocupante en ambientes clínicos, donde las infecciones nosocomiales aumentan las tasas de mortalidad entre los pacientes hospitalizados y elevan los costes asociados al control y la gestión de las infecciones²⁷³. El microbioma intestinal de los pacientes es uno de los focos más importantes de diseminación y evolución de la AMR³⁰³. Un elemento crucial en este proceso es la transferencia de plásmidos conjugativos, moléculas circulares de DNA que se replican independientemente del cromosoma bacteriano y pueden transferirse horizontalmente entre bacterias⁶⁵.

En los últimos años, numerosos estudios han caracterizado la evolución de la AMR mediada por plásmidos, ampliando la comprensión de cómo los plásmidos con genes AMR se transfieren y evolucionan en las poblaciones bacterianas. Los plásmidos con genes AMR permiten a las bacterias sobrevivir en presencia de antibióticos y, a la vez, la resistencia mediada por plásmidos puede evolucionar a través de cambios en el número de copias del plásmido (PCN)^{45,304,305}, mutaciones o duplicaciones de genes AMR codificados en plásmidos^{306,307} o mediante interacciones con mutaciones cromosómicas³⁰⁸. Sin embargo, en ausencia de antibióticos, las alteraciones fisiológicas inducidas por los plásmidos conducen con frecuencia a una reducción de la velocidad de duplicación de las células con plásmido en comparación con las mismas en ausencia de plásmido, un fenómeno conocido como coste en el *fitness* bacteriano producido por el plásmido³⁰⁹. Este coste puede mitigarse con el tiempo mediante mutaciones compensatorias en el plásmido o el cromosoma^{220,240,255}. Estudios anteriores han demostrado que los costes asociados a los plásmidos con genes AMR se derivan principalmente de la expresión de genes de resistencia^{233,309–311}. Esta idea sugiere que las bacterias portadoras de plásmidos AMR probablemente experimentan un conflicto entre

los niveles de resistencia a antibióticos y el *fitness* bacteriano^{312,313}. No obstante, a pesar de la importancia de estos estudios anteriores, la comprensión actual de la evolución de la resistencia mediada por plásmidos se deriva casi por completo de experimentos muy controlados realizados *in vitro*. La falta de acceso a colecciones bacterianas de origen clínico, junto con la dificultad de realizar manipulaciones genéticas con aislados bacterianos silvestres y multirresistentes, ha impedido el estudio de la evolución de los mecanismos de AMR mediada por plásmidos en escenarios reales y clínicamente relevantes.

En este capítulo, hemos seguido la evolución de la AMR mediada por plásmidos en el microbioma intestinal de pacientes hospitalizados. Para hacerlo, nos centramos en los plásmidos pOXA-48, que constituyen uno de los grupos de plásmidos más relevantes en los entornos clínicos de Europa^{157,275}. Los plásmidos pOXA-48 se encuentran en las enterobacterias, dando lugar a las enterobacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos (CRE), que recientemente se ha informado que son la amenaza de resistencia de más rápido crecimiento en Europa⁴⁶. Utilizamos una colección previamente caracterizada de 224 enterobacterias CRE portadoras de pOXA-48 aisladas durante un periodo de dos años de más de 9.000 pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, España. Estudiamos múltiples variantes de pOXA-48 con distintas mutaciones y dilucidamos la evolución de asociaciones específicas entre pOXA-48 y enterobacterias salvajes en el microbioma intestinal de tres pacientes. Nuestros resultados revelan que la evolución *in vivo* de la resistencia mediada por pOXA-48 está determinada por la interacción entre la AMR y los costes de *fitness* inducidos por el plásmido.

8.2.3 Métodos del capítulo II

8.2.3.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las muestras incluidas en este estudio se recuperaron del proyecto R-GNOSIS previamente descrito (ver secciones 8.1.3.1 y 8.1.3.2 del capítulo I). Todos los experimentos se llevaron a cabo en caldo de lisogenia Lennox (LB) que fue, cuando se

indica, suplementado con 15 g/l de agar (CONDA, España). Para la determinación de la concentración que inhibe el 90% del crecimiento (IC90) se utilizó el caldo Mueller Hinton II (Oxoid) y los resultados fueron comparables a los obtenidos en LB. En este estudio se utilizaron amoxicilina+ácido clavulánico (Sandoz, España), meropenem (Aurovitas, España), kanamicina, ertapenem, cloranfenicol, apramicina, estreptomicina, azida de sodio y carbenicilina (Merck, España).

8.2.3.2 Construcción de plásmidos sintéticos

En las tablas 1 y 2, puede verse el listado de cebadores y plásmidos sintéticos utilizados en este estudio. Se utilizaron dos variantes del plásmido pLC10: pLC10-Apra y pLC10-Kana (Fig. 15 A). Ambos plásmidos se diferencian únicamente en el gen de resistencia (resistencia a apramicina y a kanamicina respectivamente). El plásmido pLC10-Apra se construyó intercambiando el gen *aph(3')-Ia* (resistencia a la kanamicina) con el gen *aac(3)-IV* procedente de pMDIAI, mediante la técnica de Gibson (*New England Biolabs*, Reino Unido) siguiendo las sugerencias del fabricante (ver condiciones en Tabla 1). Los plásmidos pLC10-Kan/pLC10-Apra llevan el gen *cas9* de *Streptococcus pyogenes* bajo el control de un promotor Ptet inducible por anhidrotetraciclina (aTc), clonado en un esqueleto de plásmido pSC101 termosensible con un RNA guía bajo el control de un promotor Ptrc derivado de pCas37 (plásmido Addgene #62225). El RNA de guía única (sgRNA) dirigido al gen *pemK* de pOXA-48 (secuencia de 5' GTTGTGCCCGTGACCAGCGG 3', ver cebadores en Tabla 1) se introdujo en pLC10-Kan mediante ensamblaje Golden Gate²⁶⁸ (*New England Biolabs*, Reino Unido). Para hacerlo se realiza una fosforilación de los cebadores con los sgRNA (ver Tabla 1) a clonar (15 µl de 10 µM de cada cebador, 14 µl de H₂O, 1 µl de T4 PNK y 5 µl de solución tampón para la ligasa. Incubada 30 minutos a 37°C). Seguido de una hibridación de cebadores (añadiendo a lo anterior 2.5 µl de NaCl 1M). Para acabar, se clonaron los sgRNA mezclando 2 µl de la extracción plasmídica de pLC10, 2 µl de los cebadores hibridados anteriormente, 1 µl de tampón *CutSmart*, 1 µl de enzima Bsal-HF, 1 µl de ATP a 1 mM, 1 µl de ligasa y 2 µl de H₂O. La mezcla se incubó durante 25 ciclos de 3 minutos a 37°C y 4 minutos a 16°C. Se acabó con un ciclo de 5 minutos a 50°C y 5 minutos a 80°C. Para construir el plásmido pBGA (Fig. 15 B) se utilizó

el plásmido pBGC²⁵⁸ como fondo genético. Se sustituyó el gen *cat* del plásmido pBGC (que confiere resistencia al cloranfenicol) con el gen *aac(3)-IV* (resistencia a la apramicina) presente en el plásmido pMDIAI²⁷². El intercambio se hizo mediante la metodología de Gibson (*New England Biolabs*, Reino Unido) siguiendo las recomendaciones del fabricante (ver condiciones en Tabla 1).

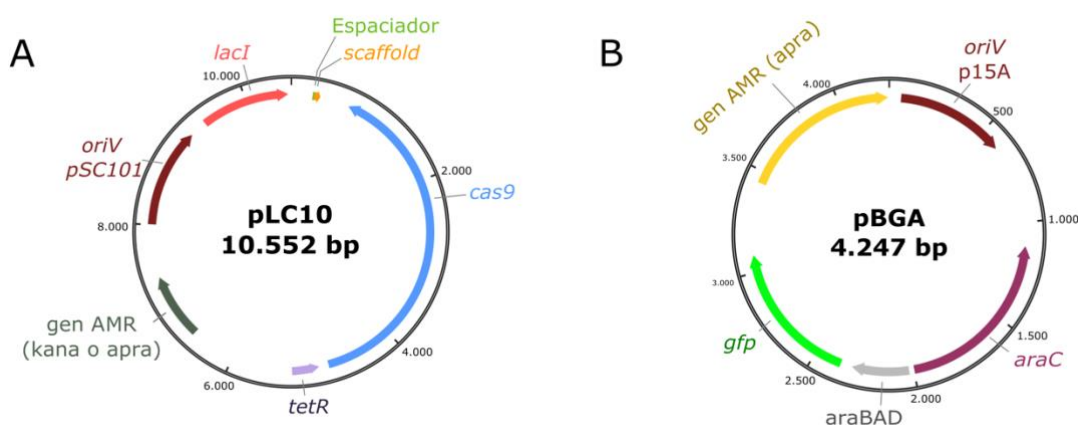


FIGURA 15. Representación de los plásmidos sintéticos utilizados en este estudio.

A) El plásmido pLC10 utilizado para curar plásmidos mediante el sistema CRISPR-Cas9. Nótese que existen dos variantes de pLC10: pLC10-Apra con el gen de resistencia a apramicina (*aac(3)-IV*) y pLC10-Kan, con el gen de resistencia a kanamicina (*aph(3')-Ia*). B) El plásmido pBGA, construido a partir del pBGC²⁵⁸, el cual solo difiere por el marcador de resistencia (apramicina y cloranfenicol respectivamente).

8.2.3.3 Extracción de DNA genómico y secuenciación

El DNA genómico se extrajo mediante el kit de purificación de DNA genómico Wizard (Promega). Los datos de secuenciación de lectura corta de las cepas clínicas se obtuvieron de los resultados del capítulo I y pueden verse en más detalle en^{172,270} y en el BioProject PRJNA626430. Además, los transconjugantes/transformantes de *E. coli* J53 y las cepas implicadas en la evolución de pOXA-48 dentro del paciente (que son K163, K165, C288, C289, K153 y K229 ver Tabla Anexo 2) se secuenciaron en el Microbial Genome Sequencing Center (MIGS, PA, EE.UU.) utilizando la plataforma NextSeq 2000 (cobertura>100x). La secuenciación de lectura larga (MinION) se realizó en el MIGS para las cepas implicadas en el pOXA-48 dentro del paciente (cobertura>100x). Los datos de

secuenciación están disponibles en el BioProject PRJNA838107. Se utilizó TrimGalore v0.6.4 y Filtlong v0.2.1 para el procesamiento de las lecturas, utilizando un umbral de calidad de 20 y eliminando los adaptadores y las lecturas <50 pb.

8.2.3.4 Ensamblaje y análisis de las variantes de pOXA-48

Se usaron los genomas ensamblados de R-GNOSIS, además de aquellos aislados por el servicio de microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal (ver capítulo I). Se utilizó pOXA-48_K8 (MT441554) como referencia en el análisis de variantes utilizando Snippy v4.6.0 y se seleccionaron los plásmidos que compartían el 72% del genoma central de pOXA-48 (n=224). A continuación, se descartaron las variantes de nucleótidos en las zonas 48.500-48.853 y 14.883-16.638. Las mutaciones en 48.500-48.853 se descartaron porque fueron identificadas como falsos positivos por secuenciación Sanger (Macrogen, España). Probablemente estos errores son el resultado de errores en el ensamblaje (datos de Illumina) ya que esta zona contiene repeticiones largas de nucleótidos. Entre 14.883-16.638 pOXA-48 contiene un intrón del grupo II (*ItrA*). La secuencia de *ItrA* se contrastó³¹⁴ con los ensamblajes de cada cepa para confirmar su presencia/ausencia en cada PV (BLASTn³¹⁴ v2.11). Las diferencias de identidad en la secuencia de *ItrA* no se tuvieron en cuenta para las variantes plasmídicas (PV). No se detectaron inserciones en los ensamblajes híbridos y las inserciones no fueron evaluadas en las cepas secuenciadas sólo con tecnología Illumina. Sin embargo, pudimos detectar manualmente una inserción del gen *bla*_{CTX-M-15} en la posición 7.018 (de la referencia pOXA-48_K8) en la variante PV-D. Esto se hizo comparando los ensamblajes y validando *in vitro* mediante PCR. Las deleciones entre PVs fueron detectadas *in silico* con BRIG³¹⁵ v0.9540 y validadas por amplificación PCR. Definimos los PVs como plásmidos similares a pOXA-48 aislados en R-GNOSIS que compartan al menos un 72% del genoma central con pOXA-48_K8 pero que presentan SNPs y/o indels cuando se comparan con él.

8.2.3.5 Introducción de variantes de pOXA-48 (PV) en aislados bacterianos

Seleccionamos 14 PV para su posterior caracterización basándonos en los siguientes criterios: (1) PV con mutaciones/deleciones no sinónimas que cubran una amplia

representación de diferentes genes y funciones y evitaran los PV con mutaciones redundantes en los mismos genes, (2) PV con inserciones y grandes reordenamientos y (3) PV con mutaciones intergénicas cerca de los genes esenciales del plásmido, como los genes implicados en la replicación, la conjugación o la partición. Las cepas silvestres de origen clínico (donantes) y *E. coli* J53 (receptora) se estrieron de los viales congelados a -80°C (de LB suplementados con 15% de glicerol) en LB agar con selección de antibióticos: ertapenem (0,5 mg/l) y azida de sodio (100 mg/l), respectivamente, y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se inocularon independientemente varias colonias donadoras y una colonia receptora en 2 ml de LB en tubos de 15 ml y se cultivaron durante 6 horas (37°C y 250 r.p.m. , Thermo Scientific™ MaxQ™ 8000). Los cultivos se centrifugaron (15 minutos, 1.500 g) y las células se mezclaron en proporción 1:2 (proporción de donante y receptor respectivamente), para después ser inoculadas en LB agar e incubadas durante la noche. Al día siguiente, se suspendió la biomasa en NaCl 0,9% y se plaquearon diluciones seriadas en medio LB agar suplementado con ertapenem y azida de sodio. La presencia de PVs en las bacterias se confirmó mediante secuenciación Illumina (MIGS). Específicamente para la variante PV-A, que no confiere un resistencia, se mezclaron donantes y receptores en proporción 10:1 (donante:receptor) y se seleccionaron los transconjugantes con azida de sodio para *E. coli* J53 o con estreptomicina 100 mg/l para la cepa de tipo salvaje. La presencia del plásmido se confirmó mediante el cribado por PCR de múltiples colonias. En el caso de la variante PV-B se aisló con el kit NucleoBond Xtra Midi Plus (Machery-Nagel, EE.UU.), y se introdujo en las bacterias por electroporación como en la referencia³¹⁶. Los transformantes se seleccionaron en agar LB con amoxicilina 200 mg/l + ácido clavulánico 40 mg/l.

8.2.3.6 Análisis genómico de *E. coli* J53 portadora de distintas PVs

Los genomas se ensamblaron con SPAdes³¹⁷ v3.15.2. La calidad del ensamblaje se evaluó con Quast³¹⁸ v5.0.2. Todos los ensamblajes alcanzaron un tamaño de 4.6-4.8 Mb y el recuento de contigs >500 bp fue inferior a 110. Se utilizó Prokka³¹⁹ v1.14.6 para anotar los genomas. Se utilizó Snippy v4.6.0 para identificar variantes en el genoma de *E. coli* J53 mediante el mapeo de lecturas de Illumina con su ensamblaje. Las variantes en las cepas

J53 portadoras de PV se obtuvieron mediante Snippy y breseq³²⁰ v0.35.6 utilizando el genoma anotado de *E. coli* J53 como referencia. Se filtraron las mutaciones que coincidían sobre si mismas con J53 descartándolas como errores de ensamblaje. Snippy se utilizó en un enfoque inverso, mapeando las lecturas de *E. coli* J53 contra los ensamblajes de los portadores de PVs. Se descartaron las mutaciones no identificadas en ambas comparaciones y por ambas herramientas. Para el análisis de pOXA-48 se ejecutaron Snippy y breseq utilizando como referencia pOXA-48_K8 (MT441554). Sólo se consideraron las mutaciones identificadas por ambos programas, así como las identificadas como *Missing coverage* por breseq. La secuencia del gen *ltrA* fue contrastada (BLASTn³¹⁴ v2.11.0) con los ensamblajes de J53 y en los portadores de PVs. El *contig* que contiene *ltrA* tenía una longitud similar en todos los ensamblajes y una cobertura diferente a la de los *contigs* cromosómicos, lo que indica que el gen *ltrA* no se trasladó al cromosoma de J53. Los replicones de plásmidos se detectaron con ABRicate v1.0.1 utilizando la base de datos plasmidfinder³²¹. Se utilizó la base de datos Resfinder³²² y ABRicate para descartar la presencia de otros genes de resistencia.

8.2.3.7 Ensayos de competición para caracterizar el *fitness* relativo de las bacterias

Se caracterizó fenotípicamente el *fitness* relativo de las bacterias portadoras de distintas PVs. Los ensayos de competición se realizaron utilizando cepas marcadas con GFP para distinguir entre poblaciones en citometría de flujo (Plataforma CytoFLEX Beckman Coulter Life Sciences, USA). Los parámetros fueron: Velocidad de flujo de 50 $\mu\text{l min}^{-1}$, tamaño del núcleo de 22 μm y 10.000 eventos por pocillo (en placa de 96 pocillos). El ensayo se realizó compitiendo cada genotipo contra una cepa marcada con GFP. En *E. coli* J53, cada genotipo tenía 6 réplicas y el competidor común era la cepa sin pOXA-48 y con pBGC²⁵⁸. En las cepas clínicas, las competiciones se realizaron enfrentando cada genotipo (sin pOXA-48, y la misma cepa portadora de diferentes PV contra un competidor común con pBGC). Cada genotipo se obtuvo a partir de eventos de conjugación/transformación independientes, lo que dio lugar a 3 réplicas independientes medidas 6 veces cada una (n=18 para cada genotipo). Los competidores comunes para las cepas clínicas fueron HKH*/PV-K + pBGA, JWC*/PV-A + pBGC y WDV*/PV-B + pBGA

para cada caso. Los competidores comunes también eran portadores de PV para evitar la transferencia conjugativa durante los ensayos de competencia mediante mecanismos de exclusión de plásmidos³²³. Obsérvese que pBGA (Fig. 15 B) sólo se diferencia de pBGC en el gen de resistencia (resistencia a la apramicina y al cloranfenicol, respectivamente). Estos plásmidos contienen un gen *gfp* que está bajo el control del promotor P_{BAD}, por lo que la producción de GFP está controlada por la presencia de L-Arabinosa. Se lanzaron pre-cultivos que se incubaron durante la noche en LB en placas de 96 pocillos a 250 r.p.m. (Thermo Scientific™ MaxQ™ 8000) 37°C, luego se mezclaron 1:1 y se diluyeron 400 veces en 200 µl de LB fresco en placas de 96 pocillos (Thermo Scientific, Dinamarca), y se incubaron durante 24 horas en las mismas condiciones. Las poblaciones iniciales se mezclaron (1:1) y luego se diluyeron 400 veces en 200 µl de NaCl 0,9% con L-arabinosa 0,5% (Sigma, España) y se incubaron a 37°C a 250 r.p.m. durante 1,5 horas para inducir la expresión de GFP. Tras 24 horas, se determinaron las proporciones finales como se ha descrito anteriormente. El *fitness* de cada cepa en relación con la etiquetada con GFP se determinó mediante la ecuación (1):

$$(1) w = \frac{\ln\left(\frac{N_f}{N_i}\right)}{\ln\left(\frac{N_f \text{ } gfp}{N_i \text{ } gfp}\right)}$$

Donde *w* es el valor de *fitness* relativo de cada cepa que lleva una variante determinada de pOXA-48 en comparación con el competidor marcado con GFP. *N_i* y *N_f* son el número de células de los clones sin *gfp* al principio (*N_i*) y al final (*N_f*) de la competición. *N_i gfp* y *N_f gfp* son el número de células del competidor común marcado con GFP al principio y al final de la competición, respectivamente. Controlamos y descartamos la pérdida de PV durante la competición mediante el cultivo individual de las bacterias portadoras de PVs en agar LB y antibióticos selectivos para plásmidos y contando las unidades formadoras de colonias por ml (cfu/ml) al principio y al final del ensayo (la PV-A se analizó por PCR). El valor de *fitness* relativo (*w*) se normalizó utilizando la *w* de los competidores comunes en cada caso. También se descartó una infrarrepresentación de los costes del plásmido durante el ensayo de competición en *E. coli* J53 debido a la transferencia conjugativa, comparando los datos de la curva de crecimiento (utilizando el área bajo la curva de

crecimiento, AUC) con el *fitness* relativo (*w*), correlación de Pearson $cor=0,936$, $t=9,666$, $df=13$, $P<0,001$.

8.2.3.8 Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron como en³²⁴. Brevemente, las cepas previamente guardadas en el congelador se sembraron en LB-agar sólido y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente se usaron colonias individuales para crecer cultivos de 2 ml de LB que fueron incubados durante la noche a 37°C con agitación continua (250 r.p.m., Thermo Scientific™ MaxQ™ 8000). A continuación, los cultivos ($n=6$) se diluyeron 1:1.000 en LB fresco en placas de 96 pocillos de fondo plano (Thermo Scientific, Dinamarca), que se incubaron durante 24 horas a 37°C 250 r.p.m. . Las densidades ópticas (OD600) se midieron cada 10 minutos durante la incubación en un lector de placas (Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek Instruments, USA). El área bajo la curva de crecimiento (AUC) se determinó utilizando los paquetes *growthrates* v0.8.2 y *flux* v0.3-0 en Rstudio 2021.09.2+382. Al determinar el coste de las variantes del plásmido en *E. coli* J53, se calculó el AUC normalizado dividiendo el AUC de cada aislado portador de pOXA-48 por el valor medio del AUC del aislado sin pOXA-48 de cada placa.

8.2.3.9 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

El perfil bacteriano de resistencia a antibióticos se determinó mediante (1) curvas de crecimiento en medio LB líquido en presencia de diferentes antibióticos y (2) el cálculo de la concentración inhibitoria del 90% del crecimiento (IC90), que corresponde a la concentración de antibiótico que inhibe el 90% del crecimiento bacteriano. Para (1) se utilizó el protocolo descrito anteriormente y para (2) las cepas se sembraron en MH-agar y se incubaron durante la noche (37°C). A continuación, y en paralelo, se utilizaron colonias individuales ($n=5$ o 10) para crecer cultivos bacterianos en medio MH líquido a 37°C durante 24 horas a 250 r.p.m. . Posteriormente, cada cultivo se diluyó 1:1.000 en medio MH y se añadieron 200 µl de la solución final a una placa de 96 pocillos de fondo

plano (Thermo Scientific, Dinamarca) que contenía la concentración de antibiótico adecuada. Los antibióticos testados fueron ertapenem, meropenem y amoxicilina + ácido clavulánico. Los valores de IC90 se midieron tras 24 horas de incubación (37°C). La densidad óptica a 600 nm (OD600) se determinó en un lector de placas Synergy HTX (BioTek Instruments, USA) después de 30 segundos de agitación orbital. Se utilizó como blanco la MH que contenía cada concentración de antibiótico.

8.2.3.10 Determinación de la tasa de conjugación de las PVs en *E. coli* J53

La tasa de transferencia de PVs se evaluó utilizando el método *end point* para superficies sólidas²⁹⁸. Se utilizó *E. coli* J53 como donador y *E. coli* J53/pBGC (un plásmido no movilizable y resistente al cloranfenicol, descrito en la referencia²⁵⁸) como receptor. Los donadores y los receptores se sembraron en agar selectivo (ertapenem 0,5. mg/l o cloranfenicol 50 mg/l). Tras una incubación de una noche a 37 °C, las colonias de cada cepa donante y receptora se inocularon independientemente en 2 ml de LB en tubos de cultivo de 15 ml y se incubaron durante la noche a 37 °C y 250 r.p.m. (Thermo Scientific™ MaxQ™ 8000). A continuación, se mezclaron 100 µl de donador y receptor en una proporción 1:1 y se incubaron en una placa de agar LB a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas de cada mezcla en NaCl 0,9% y se sembraron en medios selectivos para cada genotipo (carbenicilina 100 mg/l, cloranfenicol 50 mg/l y ambos antibióticos juntos).

8.2.3.11 Determinando el número de copias del plásmido (PCN) por PCR cuantitativa (qPCR)

Cada genotipo se sembró en agar LB y se incubó durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se suspendieron 2 colonias independientes en 800 µl de agua estéril (Fisher Scientific, España) y se hirvieron durante 10 minutos (95°C). Cada muestra se centrifugó para precipitar los restos celulares. A continuación, se realizaron 3 reacciones independientes por colonia y por triplicado, con 1 µl del sobrenadante como molde de DNA y utilizando

con el NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x), el kit ROX plus (NZYtech, Portugal) y el sistema 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, USA). Los genes plasmídicos y cromosómicos utilizados fueron *bla*_{OXA-48} (tamaño del amplicón 200 bp; eficiencia 97,35%, $r^2=0,996$) y *dnaE* (gen cromosómico³²⁵, tamaño del amplicón 200 pb; eficiencia 98,44%, $r^2= 0,989$) respectivamente. La concentración final de cebadores fue 1,6 μ M. La eficiencia se calculó utilizando diluciones de ¼ en serie de la cepa K8 (PV-I) y J53/PV-I como en³²⁶. Las condiciones de amplificación fueron 5 minutos (95°C) seguidos de 30 ciclos de 15 segundos, 30 segundos (55°C) y 30 segundos (60°C). El número relativo de copias del plásmido se calculó mediante la ecuación (2):

$$(2) PCN = \frac{(1 + Ec)^{CTc}}{(1 + Ep)^{CTp}}$$

donde *PCN* es el número de copias del plásmido por cromosoma, *Ec* y *Ep* son las eficiencias de las reacciones cromosómicas y plasmídicas (en relación a 1), y *CTc* y *CTp* son los ciclos umbral para las reacciones cromosómicas y plasmídicas.

8.2.3.12 Curando y reintroduciendo PVs en aislados clínicos

En este proyecto se han utilizado plásmidos sintéticos con la maquinaria CRISPR-Cas9 para eliminar (o “curar”), plásmidos AMR. Concretamente se utilizaron dos versiones diferentes de plásmidos portadores de la maquinaria CRISPR-Cas9: pLC10-Kan (resistente a la kanamicina) y pLC10-Apra (resistente a la apramicina). El sistema CRISPR-Cas9 de pLC10 contiene dos componentes principales: un RNA guía (sgRNA) y una endonucleasa asociada a CRISPR (proteína Cas9). El sgRNA está compuesto por el *scaffold* (en inglés) y el espaciador (o *spacer* en inglés). El *scaffold* es un RNA necesario para el acoplamiento molecular de la guía dentro de Cas9. El espaciador contiene 20 nucleótidos que proporcionan la especificidad a la diana, que en este caso corresponden a una parte de la secuencia del gen (se usa *pemK* en el caso de pOXA-48). Una vez expresados, la proteína Cas9 y el sgRNA forman un complejo que implica un cambio de conformación Cas9. El complejo rastrea el genoma en busca de una secuencia específica (conocida como PAM, que en este caso corresponde con la secuencia NGG) y se une a la diana (8-10 bases en el extremo 3' de la secuencia diana). Una vez unida comenzará a unirse al DNA diana en dirección 3' a 5'. Cas9 experimenta un segundo cambio conformacional al unirse por

completo a la diana que posiciona los dominios de la nucleasa para escindir ambas cadenas del DNA. El resultado final del corte mediado por Cas9 es un corte de doble hebra en el DNA diana (a ~3-4 nucleótidos de la secuencia PAM). Este corte, no es capaz de repararse por la célula e implica la pérdida del plásmido (Fig. 16).

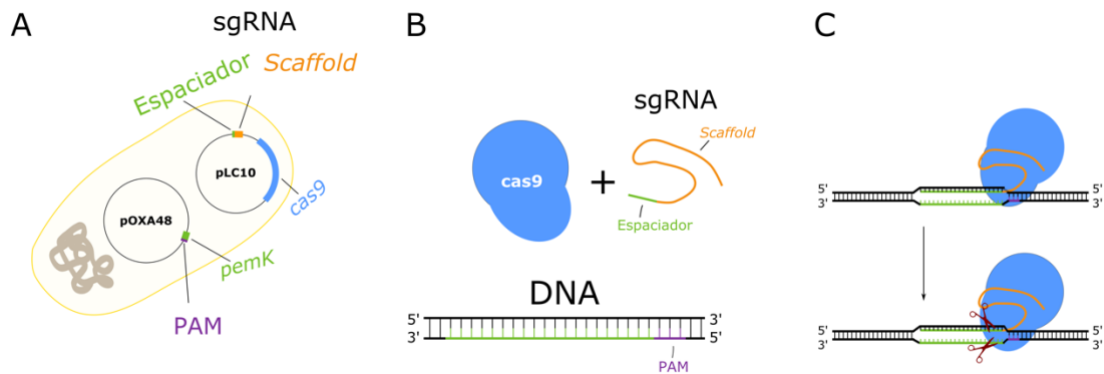


FIGURA 16. Funcionamiento del sistema CRISPR-Cas9 para curar plásmidos.

A) Esquema representativo y no a escala de una célula con el plásmido pOXA-48 y el plásmido pLC10. Nótese que el plásmido pOXA-48 contiene el gen *pemK*, el cual es usado como diana en el sgRNA en pLC10. B) Representación no a escala del complejo CRISPR-Cas9. En azul la proteína Cas9, los RNA con la secuencia diana (20 nucleótidos del gen *pemK*) y el *scaffold*. El DNA reconocido por el sistema se representa más abajo donde se indica la secuencia de homología (verde) y la secuencia PAM (lila). C) Representación de la unión del complejo Cas9-sgRNA al DNA portador de la secuencia PAM (lila) y la secuencia diana (verde). La flecha simboliza el paso de un estado a otro, donde se muestra como la unión genera un corte de doble hebra (indicado con unas tijeras).

El plásmido pLC10-Kan se utilizó en las cepas JWC* y HKH* y pLC10-Apra en WDV*. Primero se hicieron competentes las cepas portadoras de pOXA-48 siguiendo el protocolo descrito en³¹⁶. A continuación, cada pLC10 se introdujo en las células por electroporación utilizando cubetas de 0,1 cm y un pulso de 1,8 kV (MicroPulser Electroporator, Biorad España). Las células transformantes se seleccionaron en placas de LB agar con kanamicina 250-512 mg/l o apramicina 30 mg/l para cada caso. Las células transformantes se verificaron mediante PCR (ver cebadores en Tabla 1). A continuación, se indujo la maquinaria CRISPR-Cas9 suspendiendo varias colonias transformantes en 500 µl de LB con kanamicina o apramicina, 0,2 mg/l de anhidrotetraciclina (aTc), para activar la expresión de Cas9, e IPTG 0,08 mM para potenciar la expresión del sgRNA. Nótese que el sistema producirá cortes de doble hebra que la bacteria no será capaz de reparar, acabando en una pérdida del plásmido. A continuación, las suspensiones se incubaron

durante 2 horas a 30°C con agitación (250 r.p.m. , Thermo Scientific™ MaxQ™ 8000), se estriaron en LB agar y se incubaron durante la noche a 37°C para curar pLC10. Hay que remarcar que el origen de replicación de los plásmidos pLC10 se basan en pSC101 y codifican una proteína de replicación termosensible que no es funcional a 37°C. Al día siguiente, las colonias individuales se estriaron en paralelo en LB agar y en LB agar suplementado con ertapenem 0,5 mg/l, kanamicina o apramicina. Sólo se recuperaron las colonias que eran sensibles a ambos antibióticos ya que correspondían a las células sin pOXA-48 y sin pLC10. Una vez verificada su ausencia por PCR, las células libres de los dos plásmidos (pOXA-48 y pLC10) se secuenciaron por Illumina (MIGS, PA, EE.UU.). Después, se reintrodujeron diferentes variantes de plásmidos por triplicado (en paralelo) en células libres de plásmidos, tal como se ha descrito anteriormente. En la figura 17 se muestra el procedimiento seguido para estudiar los casos de evolución plasmídica intrapaciente.

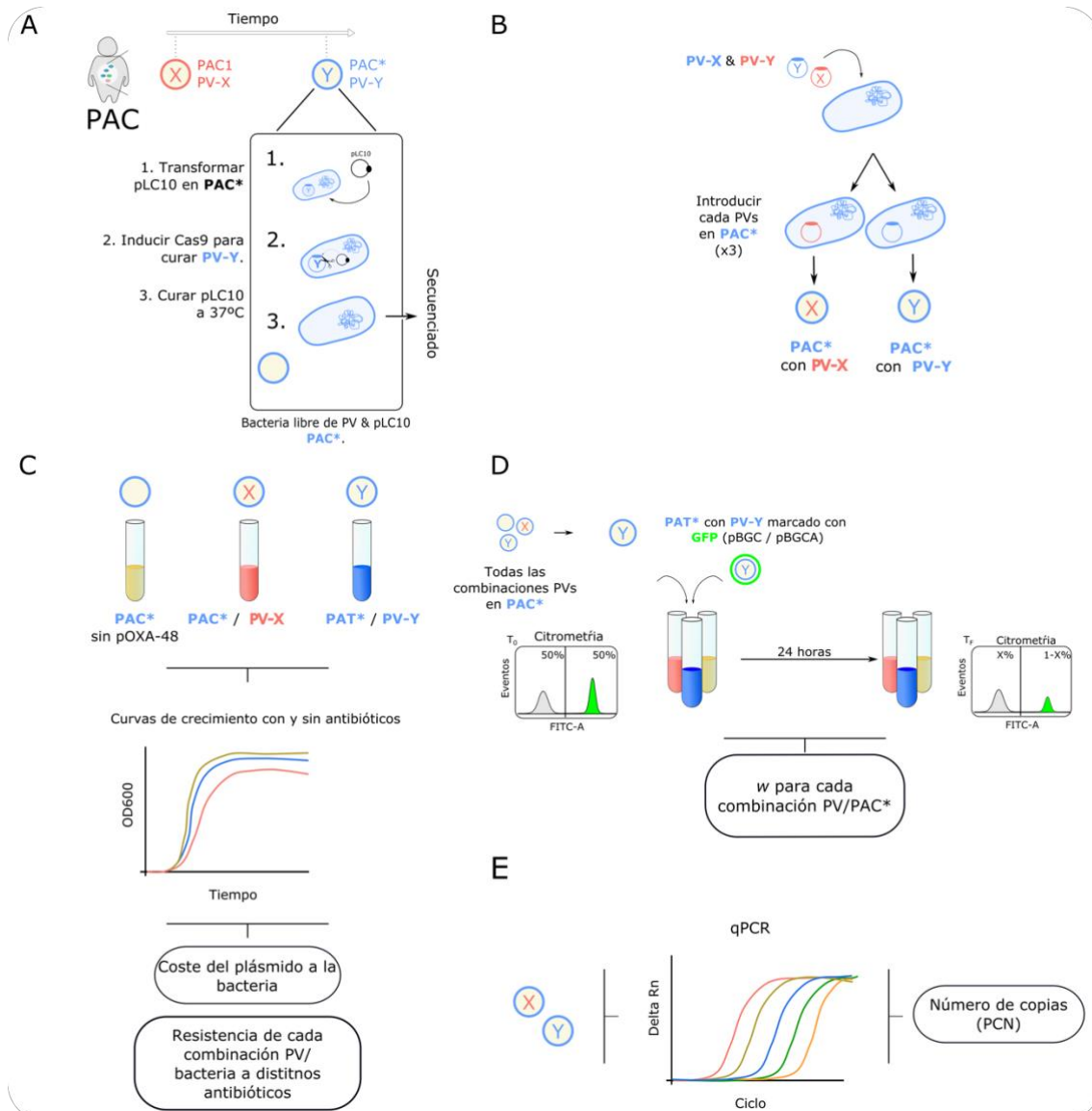


FIGURA 17. Procedimientos utilizados para estudiar la evolución intra-paciente de variantes del plásmido pOXA-48.

A) Se seleccionó el aislado donde se identificó la nueva PV (indicado por el código del paciente y un asterisco, PAC* en la figura). Nótese que cada PV se indica en un color distinto. A continuación, se introdujo el pLC10 con el sistema CRISPR-Cas9 en el aislado. Mediante la inducción del sistema se curó el plásmido pOXA-48. Para acabar, se eliminó el pLC10 cultivando el huésped a 37°C y se secuenció el aislado curado. B) Se reintrodujeron las distintas PVs en el aislado curado y se confirmó su presencia por PCR (ver cebadores en tabla 1). C) Se evaluó el coste del plásmido en el *fitness* bacteriano mediante curvas de crecimiento (ver apartado 8.2.3.8) y curvas de crecimiento en presencia de antibióticos (ver apartado 8.2.3.9). D) Se calculó el coste biológico del plásmido en el *fitness* bacteriano mediante ensayos de competición por citometría de flujo (ver apartado 8.2.3.7). E) Se calculó el número de copias del plásmido (PCN) mediante la técnica qPCR (ver apartado 8.2.3.11).

8.2.3.13 Análisis de la evolución intra-paciente de la AMR mediada por pOXA-48

Se identificaron 4 casos potenciales de evolución intra-paciente de pOXA-48 en los pacientes: HKH, JWC, WDV y HAX. La caracterización en HAX se descartó ya que los PV se diferenciaban entre sí solo por un SNP sinónimo (Tabla Anexo 1 y Tabla Anexo 2). Se utilizó Unicycler³²⁷ v0.4.9 con los parámetros por defecto para obtener ensamblajes híbridos de las cepas K153, K229, C288, C289, K163 y K165. También se utilizó Flye³²⁸ v2.9 para ensamblar las lecturas largas y se confirmó con Bandage³²⁹ v0.8.1. Se utilizó Medaka v1.4.3 para la obtención de las secuencias consenso. Se realizaron varias rondas de Pilon³³⁰ v1.24 para mapear las lecturas de Illumina. Los *contigs* se rotaron con Circlator fixstart³³¹ v1.5.5. La calidad del ensamblaje se controló con IGV³³² v2.11.1. Los ensamblajes de las PVs se confirmaron mediante el mapeo de las lecturas largas y cortas y la alineación de los ensamblajes con la referencia pOXA-48_K8 (MT441554) con BWA-MEM³³³ v0.7.17 y minimap2³³⁴ v2.21. Las alineaciones se visualizaron en IGV. Los ensamblajes cerrados se anotaron con PGAP³³⁵ v2021-07-01.build5508. Se utilizó Breseq v0.36.0 para identificar SNPs y variantes estructurales. Para descartar falsos positivos se ejecutó breseq en diferentes combinaciones. Para K164, K165-2 curado, K165-1, K165-3, K165-4, K165-5, K165-6, K165-7 y K166 (JWC), K151, K152, K229 curado (WDV) y C289 curado (HKH), las lecturas se mapearon a las cepas cerradas de sus respectivos pacientes. Se utilizó ABRicate v1.0.1 con las bases de datos de plasmidfinder y resfinder para controlar el perfil plasmídico y de resistencia a antibióticos *in silico* entre las cepas evolucionadas y curadas dentro del paciente. Se ofrecen más detalles sobre los criterios de análisis en https://github.com/LaboraTORIbio/within_patient_evolution.

8.2.3.14 Análisis filogenético

Se utilizó Snippy v4.6.0 para identificar SNPs entre todas las *E. coli* ST10 y ST744 (referencia C288), *K. pneumoniae* ST11 (referencia K153) y *K. pneumoniae* ST307 (referencia K163) de la colección R-GNOSIS. La cepa K25 (ST11) se excluyó del análisis porque los archivos *fastq* estaban truncados. Se utilizó *Snippy-core* para determinar el genoma central. La cepa K78 (ST11) se excluyó por su lejanía filogenética con el resto de cepas. Se utilizó Gubbins²⁹¹ v3.1.4 para eliminar las regiones recombinantes. Los árboles de máxima verosimilitud se construyeron con IQ-TREE²⁹² v1.6.12 a partir de los alineamientos extraídos con la detección del mejor modelo evolutivo y un *bootstrap*

ultrarrápido de 1000 optimizado mediante el intercambio de vecinos más cercanos (NNI) en el correspondiente alineamiento *bootstrap*. Los árboles se visualizaron y editaron en iTOL²⁹³ e Inkscape v0.17.

8.2.3.15 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en Rstudio 2021.09.2+382 (R v4.1.1 2021-08-10) con los paquetes *rstatix* v0.7.0, *tidyverse* v1.3.1 y *car* v3.0-12. Para comprobar la homocedasticidad y la normalidad de los datos para cada conjunto de datos, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, la prueba de Levene y la prueba de Bartlett. Luego, según la distribución de cada grupo de datos, se realizaron pruebas paramétricas y no paramétricas (véase en la sección de resultados para cada prueba). Se realizó un modelo aditivo generalizado (GAM) utilizando el paquete R *mgcv* v1.8-40 con los valores de *w* como variable dependiente y el número de copias del plásmido, la resistencia a los antimicrobianos y las tasas de conjugación como variables explicativas. En el modelo se utilizó un ajuste no lineal para las variables independientes. El modelo fue validado controlando que los residuos estaban distribuidos aleatoriamente y no había concurvidad.

8.2.4 Resultados específicos del capítulo II

8.2.4.1 Análisis de las variantes de pOXA-48

Para identificar las mutaciones potencialmente asociadas a la evolución de la resistencia a antimicrobianos (AMR) mediada por plásmidos, caracterizamos los genomas de los plásmidos pOXA-48 aislados de cepas del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Tabla Anexo 1). La comparación de las secuencias completas de los 224 plásmidos pOXA-48, identificó un total de 35 variantes plasmídicas. Definimos PVs como variantes estructurales de plásmidos pOXA-48 con cualquier SNP o inserción/delección (indel) en comparación con la variante más común (PV-I), la cual está presente en aproximadamente el 67% de los aislados de la colección (Fig. 19). Con esto, nos centramos en el estudio de un único plásmido, pero con múltiples variantes genéticas (n=35) en toda la colección.

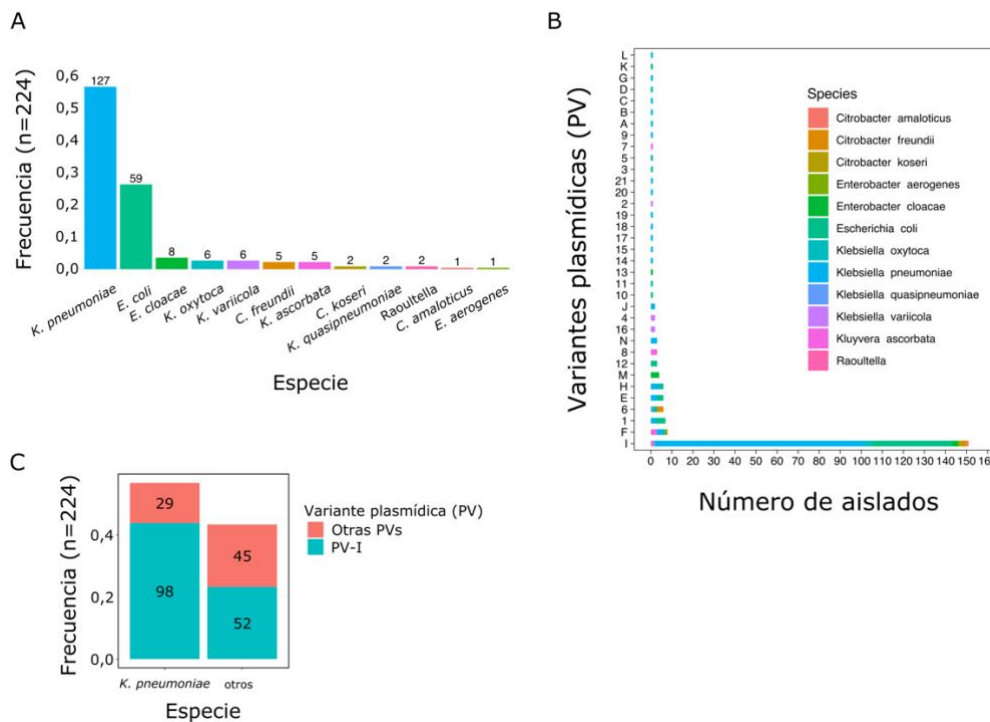


FIGURA 18. Distribución de las PVs aisladas en el HURYC.

A) Frecuencia de cada especie de los aislados en la colección de enterobacterias portadoras de pOXA-48. Los números arriba de las barras indican el número de aislados. B) Distribución de las distintas PV aisladas en la colección (n=35) agrupadas por especie (colores). C) Frecuencia de los aislados de *K. pneumoniae* respecto a otras enterobacterias que portan la variante más común de pOXA-48, PV-I, u otras PVs. Los colores corresponden a cada PVs y el número dentro de las barras corresponde al recuento de aislados. Figura modificada de DelaFuente *et. al.*²⁷¹.

A continuación, estudiamos los efectos fenotípicos y genotípicos de una selección de 14 de las PV (Fig. 19 A). Las 14 variantes de pOXA-48 se seleccionaron en base a los siguientes criterios: (1) PVs con mutaciones/deleciones no sinónimas que representaran los diferentes genes y funciones del plásmido y evitando PVs con mutaciones redundantes, (2) PVs con inserciones y grandes reordenamientos; y (3) PVs con mutaciones intergénicas cerca de genes esenciales del plásmido, como los genes implicados en la replicación, conjugación o partición. Las 14 PV se introdujeron en *Escherichia coli* J53²⁹⁷ (derivada de K-12), utilizada como huésped bacteriano isogénico común para diseccionar específicamente los efectos del plásmido. Se secuenciaron los genomas de J53 portadores de los diferentes PV para confirmar la presencia del plásmido y la naturaleza isogénica de los transconjugantes/transformantes. Examinamos las siguientes variables fenotípicas y genotípicas en cada transconjugante/transformante y en *E. coli* J53 sin

plásmidos: (1) efecto del plásmido en el *fitness* bacteriano, evaluado a partir de curvas de crecimiento y ensayos de competición, (2) tasa de conjugación del plásmido; (3) resistencia antimicrobiana a ertapenem, y (4) número de copias del plásmido (PCN).

Las distintas PVs produjeron diferentes fenotipos en *E. coli* J53 (Fig. 19 B-E). Por ejemplo, el efecto en el *fitness* bacteriano de la mayoría de las PVs fue similar al de la PV-I (la PV más común), presentando un coste de aproximadamente el 30%. No obstante, dos PVs se asociaron a una disminución del coste (Kruskal-Wallis chi-sq.=64,37, df=13, P<0,001, seguido de suma de rangos Wilcoxon con corrección FDR P<0,01). Una de estas variantes (PV-A) tenía una delección en el gen de la carbapenemasa *bla*_{OXA-48} que abolía el fenotipo de resistencia a ertapenem (Fig. 19 C). La otra PV (PV-B) presentaba dos delecciones: (1) una pequeña delección que afectaba al elemento IS1 aguas arriba del gen *bla*_{OXA-48} y (2) una delección de aproximadamente 13,5 kb asociada a un fenotipo no-conjugativo (Fig. 19 D) al incluir genes implicados en la conjugación. Además, tanto PV-D como PV-J presentaban tasas de conjugación más bajas que PV-I (Fig. 19 D, Kruskal-Wallis, chi-sq.=56,58, df=13, P<0,001, seguida de suma de rangos de Wilcoxon con corrección FDR P<0,01). PV-D y PV-J presentan mutaciones en genes relacionados con la conjugación: un SNP no sinónimo en *traY* y una inserción en *trbN* (PV-D), y un SNP no sinónimo en *traU* (PV-J) (ver Tabla Anexo 1 y DelaFuente *et. al.*²⁷¹). Por otro lado, se identificó una variante (PV-K) en la que PCN fue más elevado que el del resto de PV (Fig. 19 E, Kruskal-Wallis chi-sq.=42,09, df=13, P<0,001, seguida de suma de rangos de Wilcoxon con corrección FDR P=0,025). Este genotipo se puede explicar por la presencia de una mutación aguas arriba del gen que codifica la proteína de iniciación de la replicación RepA.

El análisis pareado de los efectos de la AMR, el PCN y las tasas de conjugación sobre los costes en el *fitness* asociados al plásmido en *E. coli* J53 reveló una correlación positiva entre la AMR y los costes en el *fitness* (Fig. 19 F, correlación de Spearman S=779,7, rho=-0,7136, P=0,004). Las PV que confieren AMR se asociaron con un alto coste de *fitness* (27%-34% de reducción en el *fitness* relativo), mientras que los dos PV que confirieron poca o ninguna resistencia sólo imponen un bajo coste en el *fitness* (<4%). Ni la conjugación ni el PCN muestran una asociación significativa con los costes en el *fitness* del plásmido (correlación de Spearman, P>0,25). Además, para ver el efecto de cada variable en el resultado de *fitness* bacteriano utilizamos un modelo aditivo generalizado (GAM) que incluía las tres variables. El modelo confirmó el resultado de las correlaciones

independientes e identificó que solo la AMR se correlacionaba con los costes en el *fitness* asociados al plásmido (GAM, AMR: $df=3$, $P=0,043$, PCN y tasas de conjugación: $df=2$ y $P>0,25$, ver sección 8.2.3.15).

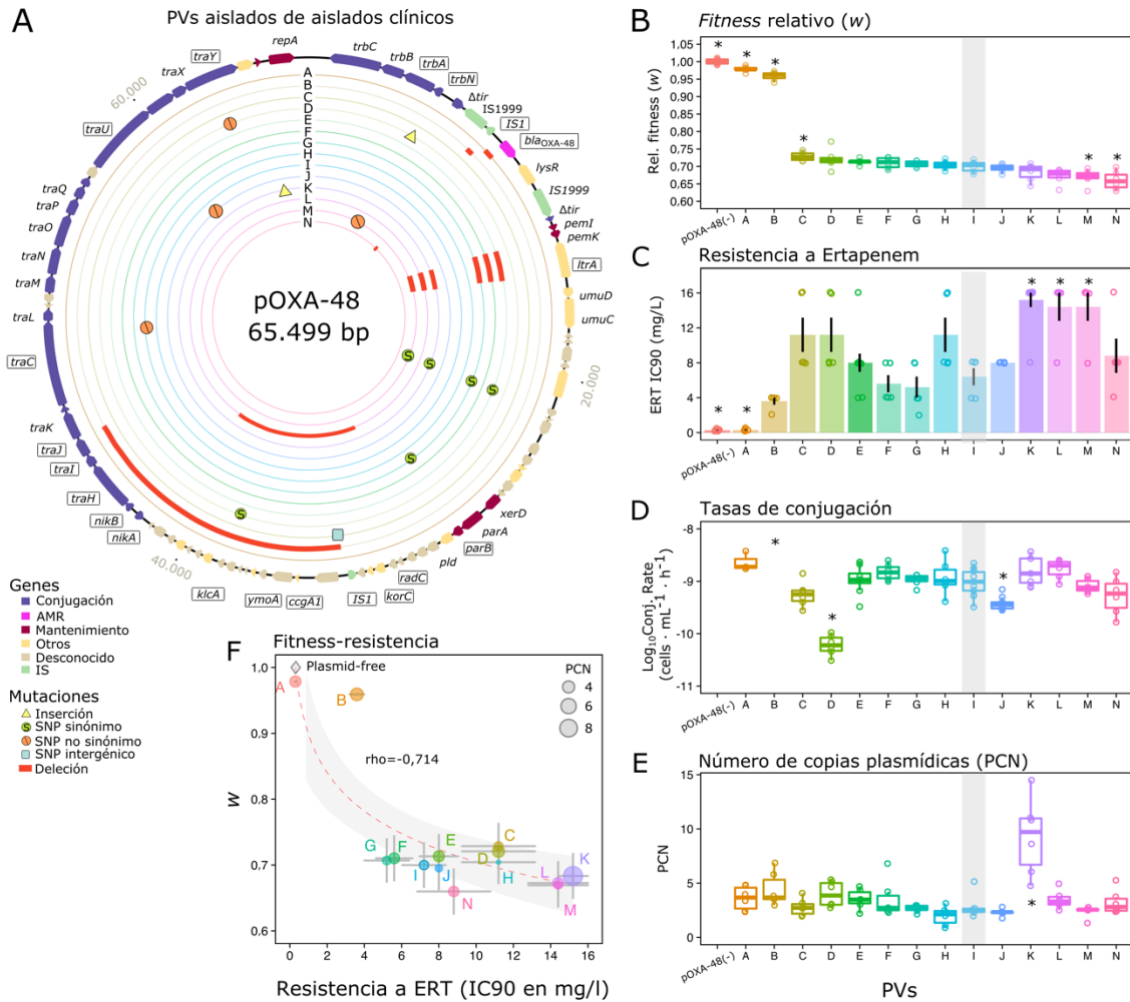


FIGURA 19. Variantes del plásmido pOXA-48 introducidas en *E. coli* J53.

A) Representación de las variantes de pOXA-48 (PVs) A-N en círculos concéntricos (para los detalles específicos de las variantes véase la leyenda). El mapa de genes en el círculo exterior representa la variante más común (PV-I, utilizada como referencia y resaltada con sombreado gris en los paneles B-E). Las flechas indican los marcos de lectura y los colores indican la clasificación funcional de los genes. Los nombres de los genes se indican en el círculo exterior, y los nombres de los genes que presentan mutaciones se representan dentro de los recuadros. B) Gráficos de caja que muestran los valores en el *fitness* relativo (w) de *E. coli* J53 portadora de distintas versiones de pOXA-48 (PVs) en relación con J53 sin el plásmido. Las líneas horizontales dentro de los recuadros indican los valores de la mediana, las bisagras superiores e inferiores corresponden a los percentiles 25 y 75, y los bigotes se extienden a las observaciones dentro de 1,5 veces el rango intercuartílico (IQR). Los puntos individuales muestran réplicas independientes ($n=6$). C) Resistencia a ertapenem (ERT) en *E. coli* J53 sin plásmido y con plásmido,

representada como la concentración inhibitoria del 90% (IC90) en mg/l. Las barras indican los valores medios y los puntos indican las réplicas individuales (n=10 para PV-K y PV-E y n=5 para el resto de PV). Las barras negras representan el error estándar de la media. D) Tasas de conjugación de diferentes PVs en *E. coli* J53 (en escala \log_{10} , n=14 para PV-I, n=9 para PV-J, n=8 para PV-E & PV-K, n=3 para PV-A, y n=6 para los restantes PVs), representadas como en el panel B. E) Número de copias del plásmido (PCN) de diferentes PV en *E. coli* J53, representado como en el panel B (n=6). Los asteriscos en los paneles B-E indican diferencias significativas en la comparación de cada PV con PV-I (Wilcoxon con corrección FDR $P < 0,01$ después de Kruskal-Wallis). F) Correlación entre los valores en el *fitness* relativo (w) y la resistencia a ertapenem (IC90) en *E. coli* J53 portadora de PV. Los puntos individuales indican el valor medio, y las líneas representan el error estándar de la media IC90 y el error estándar propagado del *fitness* relativo (w). El tamaño de cada punto es proporcional al PCN en *E. coli* J53. El rombo simboliza los valores de *E. coli* J53 sin plásmido, los cuales no se incluyeron en la correlación. Las PV individuales se indican con letras. La línea roja discontinua indica la regresión y la zona sombreada en gris cubre el intervalo de confianza del 95%. Figura modificada de DelaFuente *et. al.*²⁷¹.

8.2.4.2 Buscando eventos de evolución intra-paciente de pOXA-48

La caracterización de las variantes de pOXA-48 del apartado anterior sugirió que la correlación positiva entre el coste en el *fitness* bacteriano de los plásmidos y la AMR (*fitness*-AMR, Fig. 19 F) podrían afectar a la evolución de la AMR mediada por pOXA-48 *in vivo*. En el proyecto R-GNOSIS, se tomaron muestras periódicamente de pacientes hospitalizados colonizados por CRE, lo que generó líneas temporales de aislados. Esto nos permitió seguir la evolución de la resistencia mediada por pOXA-48 en el intestino de los pacientes.

Examinamos la línea temporal de los aislados bacterianos recogidos de pacientes y seleccionamos los casos que sugieren una evolución del plásmido dentro del paciente (es decir, la detección de distintas PVs, en el mismo huésped bacteriano, dentro del mismo paciente). En otras palabras, seleccionamos a aquellos pacientes de los que se recuperaron múltiples aislados del mismo clon bacteriano (basándonos en la identidad del genoma central, ver sección 8.2.3.4) portadores de diferentes PV a lo largo del tiempo. Entre los pacientes colonizados por enterobacterias portadoras de pOXA-48, identificamos tres pacientes cuyas líneas temporales coincidían con estas condiciones: los pacientes HKH, JWC y WDV (Fig. 19).

Tras el análisis genómico de las bacterias portadoras de pOXA-48, dos líneas de evidencia sugieren que las mutaciones del plásmido surgieron y fueron posteriormente

seleccionadas en clones específicos en el microbioma intestinal de estos tres pacientes. En primer lugar, la comparación del genoma central de todos los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* reveló una estrecha agrupación de aislados potencialmente implicados en eventos de evolución dentro del paciente (<5 SNPs entre todos los aislados para cada línea clonal, Fig. 19 B-D, Tabla Anexo 3). Este resultado sugiere que las observaciones en los pacientes HKH, JWC y WDV no son el resultado de una colonización independiente por parte de clones portadores de diferentes PV. En segundo lugar, cada uno de los nuevos PV originados en estos pacientes estaba restringido a un paciente individual, y no fue descrito en ningún otro aislado de la colección (ni siquiera en otros clones del mismo paciente). Esto, reduce la posibilidad de que estas nuevas asociaciones de bacterias-PVs se hayan generado por eventos de conjugación independientes.

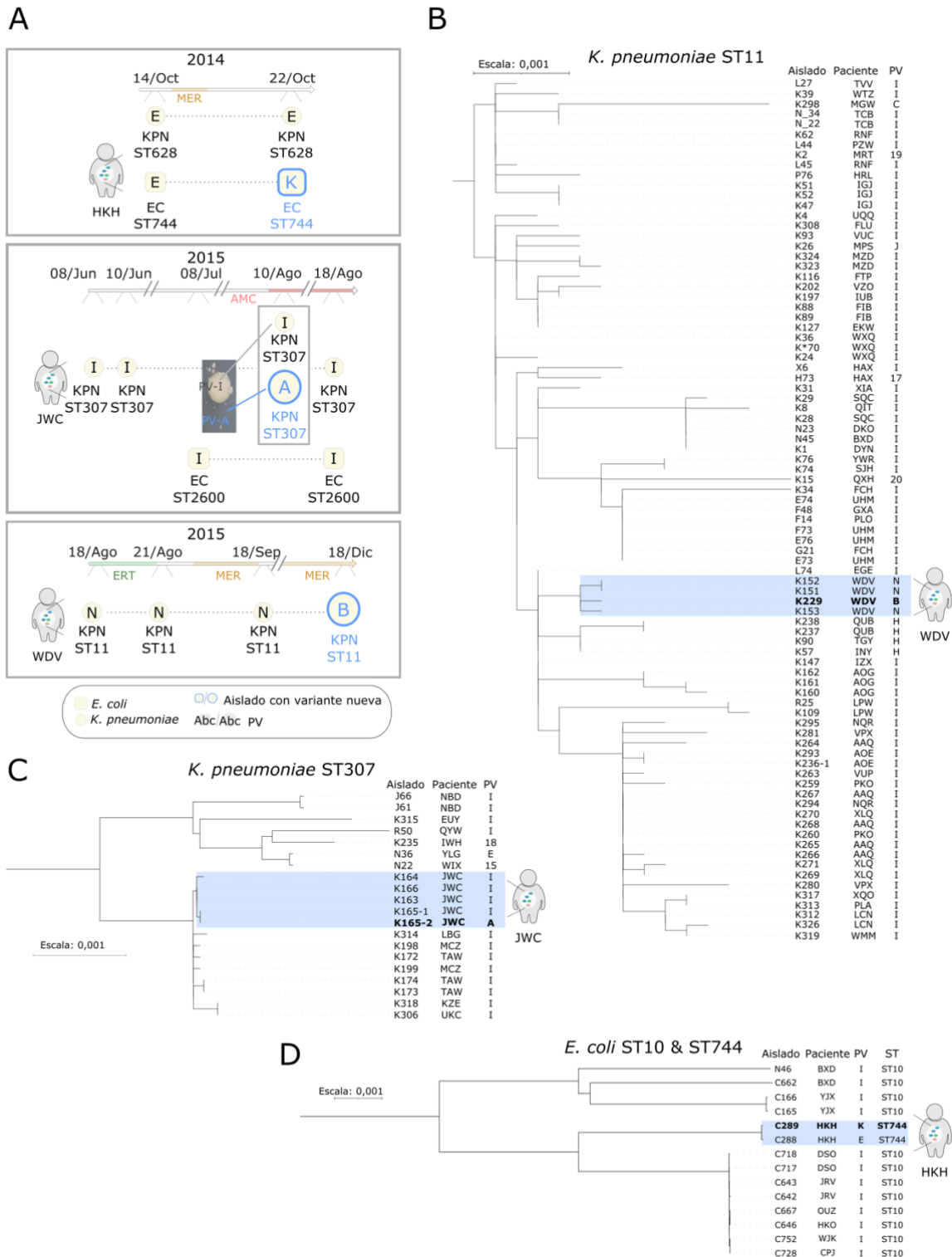


FIGURA 20. Análisis de la evolución de la AMR mediada por pOXA-48 dentro de los pacientes.

A) Líneas temporales del aislamiento de enterobacterias portadoras de pOXA-48 de los pacientes HKH, JWC y WDV (véase la leyenda). Las características de los aislamientos se detallan en la leyenda. Las fechas de las muestras se indican junto a la línea de tiempo (día/mes). Los tratamientos antibióticos que seleccionan pOXA-48 se indican en la línea de tiempo (MER para meropenem, ERT para ertapenem, AMC para amoxicilina + ácido

clavulánico). Cada PV se indica con una letra. Las especies se indican con letras y símbolos (KPN y círculo para *K. pneumoniae*, EC y cuadrado para *E. coli*). El código de secuenciotipo se indica junto a la etiqueta de la especie. Los aislamientos en los que se ha detectado la nueva PV se indican en azul y con un tamaño mayor al resto. La línea de tiempo del paciente JWC revela la aparición de dos aislados de *K. pneumoniae* co-aislados en una placa de agar suplementada con ertapenem 0,3 mg/l. B-D) Relación genética construida utilizando comparaciones de genoma central (árboles filogenéticos enraizados) de *K. pneumoniae* ST11 (n=85, B), *K. pneumoniae* ST307 (n=20, C), y *E. coli* ST10 y ST744 (n=12 y n=2 respectivamente, D) de la colección. Se indican la designación de la cepa, los códigos de los pacientes y las PV. Los aislados implicados en supuestos casos de evolución dentro del paciente se destacan en azul. Las letras en negrita marcan el aislado en el que se identificó la nueva variante. La escala del árbol indica la sustitución de nucleótidos por sitio. Figura modificada de DelaFuente *et. al.*²⁷¹.

8.2.4.3 Evolución *in vivo* de la resistencia mediada por pOXA-48

Para caracterizar la evolución intra-paciente de la AMR mediada por pOXA-48, estudiamos los aislados portadores de las nuevas PV en cada paciente. De ahora en adelante, identificamos cada aislado de estudio con el código del paciente seguido de un asterisco. En primer lugar, curamos (eliminamos) las PVs de estos aislados utilizando un sistema CRISPR-Cas9 diseñado específicamente para eliminar plásmidos de enterobacterias multirresistentes (Fig 16, Fig 17, ver sección 8.2.3.12). A continuación, para cada paciente, reintroducimos de forma independiente tanto el PV ancestral (el PV inicial presente en la misma línea clonal del mismo paciente) como los nuevos PV, en estos aislados. Para controlar el proceso, secuenciamos los genomas de los clones combinando tecnologías de lecturas cortas y largas, y volvimos a secuenciar los genomas de todas las cepas después de la curación del plásmido. Esto se hizo para asegurarnos de que no se produjeran mutaciones relevantes durante el proceso. Una vez introducidos los dos PV en cada clon, medimos (1) los efectos en el *fitness* bacteriano de cada PV, (2) la resistencia antimicrobiana (a todos los antibióticos β -lactámicos utilizados para el tratamiento en estos pacientes), y (3) el PCN para cada clon (Fig. 20 B-D). Los resultados de estos análisis se presentan en las siguientes secciones paciente por paciente en orden cronológico.

8.2.4.4 Paciente HKH. Incrementos en PCN, AMR y costes en el fitness bacteriano

En este paciente se aislaron cuatro CRE con pOXA-48 (Fig. 20 A y Tabla Anexo 1). Dos aislados pertenecían a un clon de *Klebsiella pneumoniae* ST628, y ambos portaban la

misma variante del plásmido (PV-E). Los otros dos aislados pertenecían a un clon de *Escherichia coli* ST744. El primero de los aislados de *E. coli* también era portador de PV-E, mientras que el segundo (HKH*) se aisló 8 días más tarde y era portador de una variante plasmídica diferente, PV-K, que se diferenciaba de PV-E sólo por una pequeña inserción de un par de bases aguas arriba del gen *repA*. La caracterización genotípica *in vitro* en *E. coli* J53 había revelado una asociación entre PV-K y el aumento de PCN (Fig. 19 E). El análisis de los efectos de PV-E y PV-K en el aislado HKH* también reveló que PV-K estaba presente en un PCN más alto (de 3 a 8 copias, ANOVA $F=61,42$, d.f.=1, $P_{adj}<0,001$). El elevado PCN de PV-K en HKH* se asoció a una mayor AMR a ertapenem (Wilcoxon $W=2$, $P=0,02$) y meropenem, pero a una reducción en el *fitness* bacteriano en ausencia de antibióticos (Wilcoxon, $W=306$, $P<0,001$, Fig. 21 B-D). Además, el historial clínico del paciente HKH reveló un tratamiento con meropenem antes del aislamiento de HKH*, el cual era el portador de la variante PV-K de alto PCN.

8.2.4.5 Paciente JWC. Pérdida de AMR y reducción del coste en el *fitness* bacteriano

Durante un periodo de 10 semanas, se recuperaron seis aislados portadores de pOXA-48 del paciente JWC (Fig. 20 A y Tabla anexo 1). Cuatro de ellos pertenecían a *K. pneumoniae* ST307 y los dos restantes a *E. coli* ST2600. Cinco aislados eran portadores de la variante pOXA-48 más común, PV-I, pero el aislado de *K. pneumoniae* JWC* era portador de PV-A, que difiere de PV-I por una delección de 199 bp que comienza 163 bp aguas arriba de la secuencia codificante del gen *bla*_{OXA-48}. Al igual que en el análisis de *E. coli* J53, PV-A se asoció con la pérdida de resistencia a ertapenem y a amoxicilina-ácido clavulánico en JWC*, y con una reducción de los costes en el *fitness* del plásmido en comparación con PV-I (Wilcoxon $W=0$, $P<0,001$ para ambos fenotipos). La variante PV-A también se asoció con una modesta pero significativa disminución del PCN en JWC* (ANOVA $F=6,51$, d.f.=1, $P_{adj}=0,029$, Fig 21 B-D).

En el proyecto R-GNOSIS, las CRE se recuperaron utilizando medio selectivo, por lo que fue difícil entender cómo se obtuvo el aislado de JWC* susceptible a los antibióticos en este paciente. Para investigarlo, se plaquearon las cepas originales congeladas de JWC en agar con y sin ertapenem. Las placas con antibióticos inoculadas con la cepa congelada de JWC* (pero no de los otros aislados) contenían una morfología mixta de grandes colonias resistentes de *K. pneumoniae* ST307 rodeadas de colonias susceptibles más

pequeñas de *K. pneumoniae* ST307 (Fig. 20 A). Este fenómeno es conocido como satelitismo³³⁶ y es resultado de una protección cruzada por las β -lactamasas secretadas al medio. La secuenciación de los genomas de tres colonias grandes (variante PV-I) y tres satélites (variante PV-A) confirmó que todas eran del mismo clon de *K. pneumoniae* ST307 y que las colonias satélites portaban la variante PV-A mientras que las colonias grandes portaban PV-I. Estos resultados sugieren que las dos versiones del clon de *K. pneumoniae* ST307, con los diferentes PV, coexistían en el intestino del paciente en ese momento. No obstante, aunque las bacterias portadoras de PV-A y PV-I coexistieron en el momento de la toma de muestras de JWC* (Fig. 20 A), 8 días después sólo se detectó el clon portador de PV-I (la PV asociada a la resistencia). Este cambio probablemente se explica por un tratamiento con AMC que comenzó justo antes del aislamiento de JWC*, ya que el OXA-48 confiere un alto nivel de resistencia a la AMC.

8.2.4.6 Paciente WDV. Una delección en el plásmido inactiva la conjugación

Se recuperaron cuatro aislados de *K. pneumoniae* ST11 del paciente WDV durante un periodo de cuatro meses. Los tres aislados iniciales eran portadores de PV-N, pero el último aislado (WDV*) era portador de PV-B, el cual se diferenciaba de PV-N por una delección de ~13,5 kb (Fig. 20 A y Fig. 21 A). En comparación con PV-I, tanto PV-N como PV-B presentan la misma pequeña delección que afecta al elemento IS1 aguas arriba de *bla*_{OXA-48}. La gran delección de aproximadamente 13,5 kb en PV-B afectaba a múltiples genes implicados en la conjugación, lo que condujo a la pérdida de la capacidad de conjugación en *E. coli* J53 (Fig. 20 D). En la cepa clínica, PV-B también se asoció con un fenotipo sin capacidad de conjugación, y produjo una pequeña disminución, marginalmente significativa, del coste en *fitness* en WDV* en comparación con PV-N (Wilcoxon W=101, P=0,054, Fig. 21 B). La AMR y el PCN no fueron distintos en el aislado de WDV* portador de PV-N y en el portador de PV-B (Wilcoxon W=23 y W=14.5, P>0,5, Fig. 21 C-D). En conclusión, los resultados del paciente WDV no revelaron ningún cambio claro en los efectos asociados al plásmido, aunque la ligera diferencia en el coste en el *fitness* impuesto por PV-N y PV-B podría sugerir que la gran delección en PV-B podría actuar como una mutación compensatoria (Fig. 21 F).

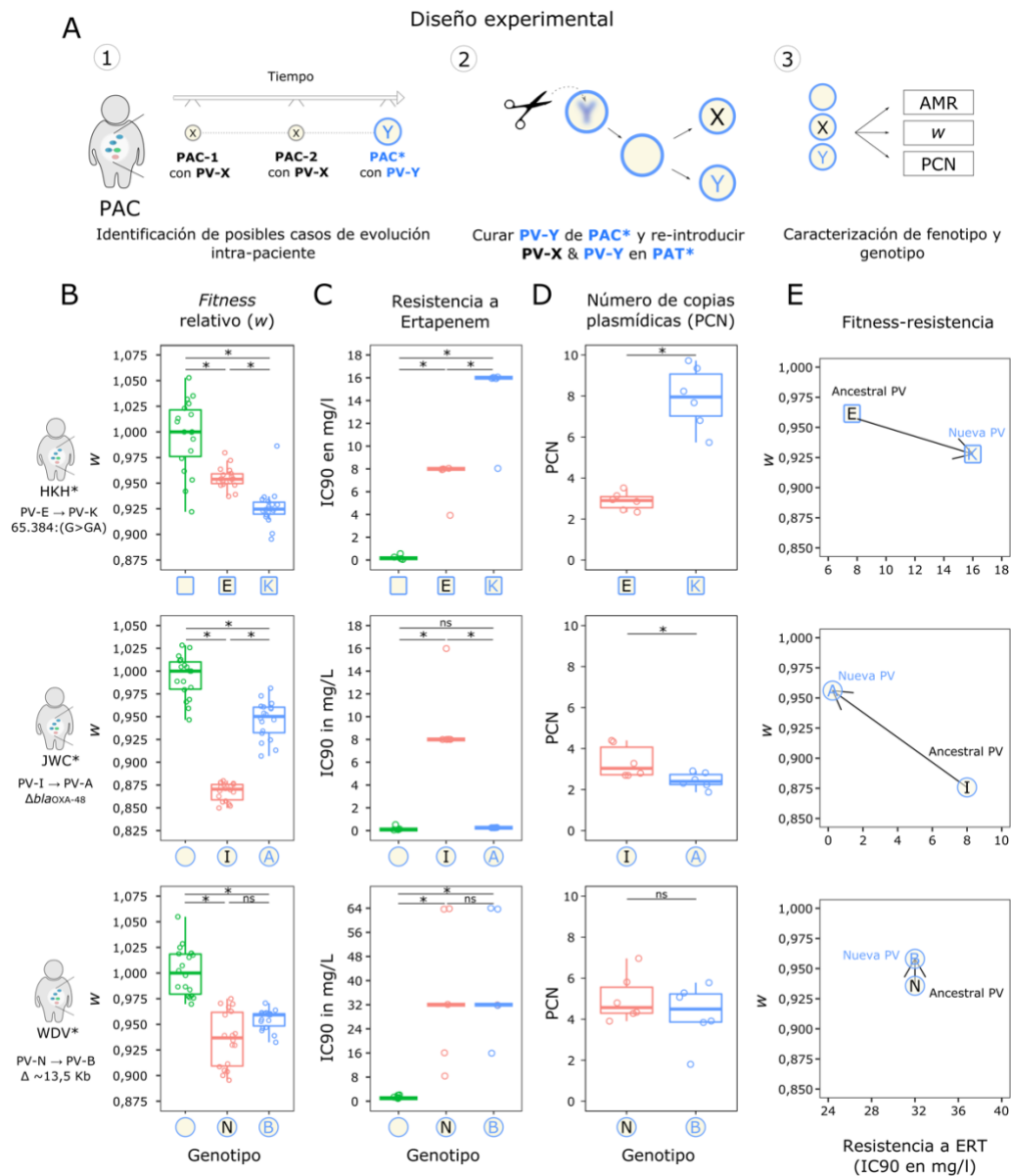


FIGURA 21. Caracterización de la evolución de la AMR mediada por plásmidos.

A) Esquema representativo de la metodología seguida para investigar la evolución intra-paciente de la AMR mediada por pOXA-48. B) Valores en el *fitness* relativo (w) de cada combinación plásmido-bacteria comparada con la cepa sin plásmido. Las líneas horizontales dentro de los recuadros indican los valores de la mediana, las bisagras superiores e inferiores corresponden a los percentiles 25 y 75, y los bigotes se extienden a las observaciones dentro de 1,5 veces el IQR. Los puntos individuales representan réplicas independientes ($n=18$). Los asteriscos en los paneles B-D indican diferencias significativas ($P < 0,05$ en Wilcoxon con corrección FDR en B y C, y $P_{adj} < 0,05$ por ANOVA en D), en la figura ns indica diferencias no significativas ($P_{adj} > 0,05$). C) Resistencia al ertapenem (ERT) medida como IC90 (mg/l) de las combinaciones sin plásmido y con plásmido. Las líneas indican los valores medios y las réplicas individuales se indican con puntos ($n=5$). D) Número de copias del plásmido (PCN) de cada PV, representado como en el panel B ($n=6$). E) Representación esquemática de la correlación entre la resistencia a los antibióticos (mediana de IC90) y el *fitness* bacteriano (mediana de w) en las cepas

de estudio. Las flechas negras representan la interacción entre el *fitness* y el AMR y las puntas de flecha indican la línea de tiempo de las PV (desde el PV ancestral hasta la PV nueva). Figura modificada de DelaFuente *et al.*²⁷¹.

9 Discusión

Las enterobacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos son una preocupante amenaza para la salud pública en todo el mundo^{46,157}, siendo los hospitales uno de los focos principales de transmisión y evolución de las CRE^{274,275,277}.

Esta tesis doctoral estudia las dinámicas de transmisión y evolución de las CRE en pacientes hospitalizados en el HURYC (Madrid, España). Para hacerlo, hemos usado como modelo una colección de enterobacterias aisladas de pacientes hospitalizados en el mismo hospital^{172,286,288}. Las enterobacterias de esta colección son portadoras de plásmidos pOXA-48, uno de los grupos de plásmidos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos más relevantes y extendidos a nivel mundial^{167,172}.

En el capítulo I, describimos las rutas de transmisión de la resistencia a antibióticos carbapenémicos a dos niveles: primero estudiamos las rutas de transmisión de clones de CRE (portadores de plásmidos pOXA-48) entre los pacientes hospitalizados en cuatro servicios del hospital. Después, detectamos las rutas de transmisión del plásmido pOXA-48 entre las enterobacterias dentro de los pacientes (transmisión intra-paciente). En el capítulo II, nos centramos en entender las dinámicas evolutivas de la resistencia a antibióticos carbapenémicos mediada por plásmidos tipo pOXA-48. Para hacerlo, primero caracterizamos la diversidad del plásmido y los efectos genotípicos y fenotípicos que causan, y a continuación, detectamos tres casos de evolución de la resistencia mediada por plásmidos pOXA-48 intra-paciente.

9.1 Sobre las rutas de transmisión de las CRE

En el capítulo I nos centramos en descubrir las rutas de diseminación de la resistencia a los antibióticos carbapenémicos mediada por plásmidos pOXA-48. Nuestros resultados proponen que la transmisión intra-hospitalaria de pOXA-48 sigue generalmente la siguiente dinámica: los clones de enterobacterias de alto riesgo portadores de pOXA-48, principalmente *K. pneumoniae* ST11, se diseminan entre los pacientes hospitalizados (Fig. 22 A). Una vez que los pacientes están colonizados, el plásmido es capaz de propagarse por conjugación a otros miembros residentes del intestino del paciente (enterobacterias como *E. coli*, *C. freundii* y *Enterobacter cloacae* entre otros, Fig. 22 B). La elevada tasa de conjugación del plásmido aumenta las probabilidades de establecerse en el microbioma

intestinal ya que, aunque se elimine el clon colonizador, pOXA-48 es capaz de transferirse y prosperar en una amplia gama de huéspedes bacterianos distintos. Además, recientemente hemos descubierto que pOXA-48 produce efectos variables de *fitness* en diferentes huéspedes bacterianos²⁵⁸. Esto abre la posibilidad a que algunas de las combinaciones bacteria-plásmido generadas por la alta transferencia de plásmidos puedan ser capaces de diseminarse con éxito a nuevos huéspedes humanos⁶³. Un ejemplo ilustrativo de esta dinámica es el caso del paciente portador de la variante 4 (o PV-H en el capítulo II) del plásmido (Fig. 12, paciente TGY). En este paciente, inicialmente se detectó una *K. pneumoniae* ST11/pOXA-48 en octubre de 2014, y 11 días después se aisló una cepa de *E. coli* (ST457) portadora de la misma variante de pOXA-48. Además, durante un nuevo ingreso 17 meses más tarde, se recuperó del microbioma intestinal del mismo paciente una *E. coli* de distinto ST (ST1722). Ésta *E. coli* ST1722 portaba la misma variante de pOXA-48 (variante 4) que la aislada de los otros clones del paciente. La presencia de la misma variante de pOXA-48 en distintos clones del paciente sugiere que el paciente estuvo colonizado durante todo el periodo por enterobacterias portadoras de pOXA-48, y que el plásmido probablemente se habría desplazado desde la *K. pneumoniae* ST11 a otros clones de *E. coli* residentes en el intestino del paciente. También detectamos que la mayoría de los eventos atribuidos a la transmisión entre pacientes se originaron en un pequeño subconjunto de pacientes (Fig. 10). Este resultado pone de manifiesto el posible papel de los pacientes superdiseminadores en la transmisión nosocomial de las CRE³³⁷.

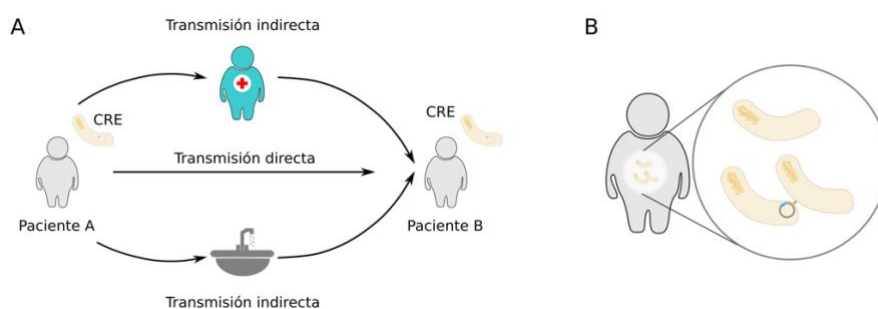


FIGURA 22. Representación de las dinámicas de transmisión de la resistencia mediada por plásmido pOXA-48 en enterobacterias.

A) Representación de la transmisión de clones CRE. La transmisión indirecta incluye reservorios ambientales del hospital (representados mediante un icono de una pila) y trabajadores del centro hospitalario (representados por un icono de persona verde con

una cruz roja). La transmisión directa entre pacientes se simboliza por una flecha directa entre los dos pacientes. B) Evento de transmisión horizontal de la resistencia mediada por plásmidos con genes AMR (círculo y caja azul respectivamente) entre las bacterias residentes en el intestino de los pacientes.

Existen ciertas limitaciones asociadas a nuestro estudio: En primer lugar, debido al diseño del estudio R-GNOSIS, sólo se recuperó un aislado por especie bacteriana y punto temporal de los pacientes. Esto hace que la diversidad genética está probablemente muy infraestimada en nuestro estudio. No obstante, la herramienta SCOTTI tiene en cuenta esta carencia²⁹⁵. En segundo lugar, no pudimos acceder a los metadatos sobre el uso de antibióticos en todos los pacientes estudiados. Por lo tanto, no pudimos investigar cómo afectaban los tratamientos antibióticos a los riesgos de colonización por enterobacterias portadoras de pOXA-48 y de transferencia de plásmidos entre pacientes. En tercer lugar, dos aspectos clave para el éxito de este estudio fueron el alto grado de conservación de la secuencia del plásmido pOXA-48 y el fuerte vínculo entre este plásmido y el gen *bla*_{OXA-48}. Estas son características particulares de pOXA-48 y *bla*_{OXA-48}, y pueden limitar la aplicación de nuestro enfoque al estudio de la epidemiología de otras carbapenemasas. Por ejemplo, la variación de los plásmidos y la frecuente transposición entre plásmidos de *bla*_{KPC} dificulta el análisis epidemiológico de los plásmidos que codifican KPC^{68,169,277,338}. Por último, sólo utilizamos datos de secuencias de lectura larga de un pequeño subconjunto de aislados/plásmidos, pero un mayor número de muestras analizadas mediante la tecnología de secuenciación de lectura larga podría haber mejorado la resolución de nuestro análisis.

Un aspecto importante del estudio descrito en el capítulo I, es el de informar sobre la mejora de las estrategias de intervención destinadas a controlar la propagación de la resistencia a los antibióticos carbapenémicos en los hospitales. Los resultados obtenidos pueden ayudar en el diseño de intervenciones para controlar la diseminación de OXA-48 en dos niveles: (1) Los resultados, en línea con otros estudios^{169,196,201,282,339}, demuestran que la propagación de enterobacterias portadoras de pOXA-48 entre pacientes en el hospital está mediada principalmente por clones de alto riesgo comúnmente asociados con infecciones nosocomiales. Estos clones residen en el entorno hospitalario y son capaces de sobrevivir en el medio ambiente, creando reservorios estables, a menudo relacionados con las superficies de las habitaciones y los baños³⁴⁰⁻³⁴³, y que pueden ser

puntos calientes de transmisión (Fig. 11). Por lo tanto, proponemos que las medidas para detectar y controlar los reservorios ambientales y los puntos calientes de transmisión podrían prevenir la diseminación de pOXA-48 entre los pacientes. (2) Por otro lado, los resultados sugieren que parte del éxito de pOXA-48 se basa en su capacidad de conjugación. Por lo que controlar la transferencia horizontal del plásmido dentro de los pacientes mediante el bloqueo de la conjugación del plásmido³⁴⁴ o incluso la eliminación del plásmido^{345,346}, podría ayudar a la prevención de la transferencia de la resistencia.

9.2 Sobre la evolución de la resistencia mediada por pOXA-48

En el capítulo II nos centramos en estudiar la evolución de la resistencia a antibióticos mediada por los plásmidos pOXA-48 en el intestino de pacientes hospitalizados en el HURYC (Madrid, España).

Muchos de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos están asociados con un coste en el *fitness*³⁰⁹. La correlación entre el *fitness* bacteriano y la AMR afecta directamente las dinámicas evolutivas de la resistencia a antimicrobianos y ha sido objeto de estudio durante los últimos años^{312,347}. Sin embargo, a pesar de que los plásmidos son uno de los vehículos más importantes para la adquisición de AMR en muchos patógenos importantes, el efecto de esta correlación en la evolución de la AMR mediada por plásmidos sigue sin estar claro. Diversos estudios muestran como la expresión génica de la AMR es una de las principales causas de los costes en el *fitness* bacteriano asociado a los plásmidos^{233,309-311}, lo que sugiere que el equilibrio *fitness*-AMR descrito en el capítulo II (ver Fig. 23) afecta la evolución de la AMR mediada por plásmidos de forma general.

Los resultados obtenidos en el capítulo II pueden llevarnos a interpretar que, en ausencia de presión antibiótica, la selección natural favorece las mutaciones que inactivan los genes de resistencia codificados en plásmidos o incluso la pérdida de los mismos. Sin embargo, esta interpretación puede verse afectada por dos líneas de evidencia: (1) Detectamos la coexistencia de subpoblaciones portadoras de distintas PV en un mismo paciente (JWC). Esta coexistencia podría ayudar a las bacterias resistentes a sortear las limitaciones evolutivas impuestas por el equilibrio entre *fitness* y AMR. Además, la estabilidad de la coexistencia podría verse afectada por los tratamientos antibióticos, que suelen ser frecuentes en pacientes hospitalizados. Nuestros resultados, junto con los

hallazgos de otros estudios recientes^{122,258,348} muestran que la diversidad genética promueve la evolución de la AMR. No obstante, la mayor parte de las investigaciones realizadas hasta la fecha sobre la evolución de la resistencia a los carbapenemas mediada por plásmidos (incluido los estudios del capítulo I y II) no han puesto el foco en la diversidad genética de los pacientes. (2) En segundo lugar, altas tasas de HGT (como las descritas en el capítulo I²⁷⁰) podrían contribuir al mantenimiento del plásmido en el microbioma intestinal de los pacientes a través de la dinámica fuente-sumidero²²⁰. Esto también podría contribuir a sortear las limitaciones impuestas por el equilibrio entre *fitness* y AMR, donde un flujo constante de plásmidos a distintos huéspedes bacterianos podría favorecer la adaptación de nuevas asociaciones plasmid-bacteria²⁴⁰. Esta dinámica queda ejemplificada en nuestros resultados, donde primero describimos un evento de conjugación *in vivo* de pOXA-48 mediada por un clon de *E. coli* aislado en el paciente HKH (capítulo I). Y más tarde, en el capítulo II, describimos la evolución de pOXA-48 en el mismo clon del mismo paciente.

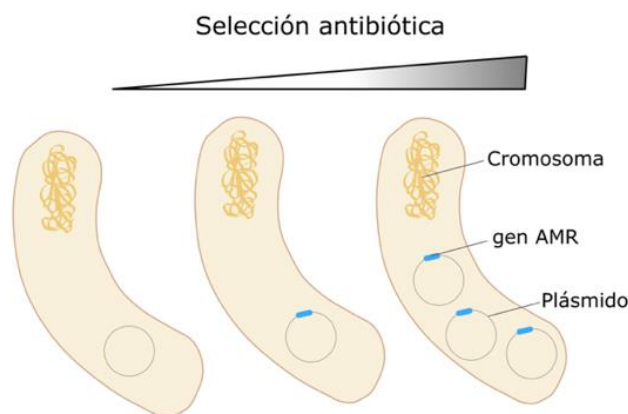


FIGURA 23. Esquema representativo de las trayectorias evolutivas de los plásmidos pOXA-48.

Nótese el equilibrio entre la resistencia a los antibióticos y el coste plasmídico en el *fitness* bacteriano modulado por el tratamiento con antibiótico.

Teniendo todo lo anterior en cuenta, pocos trabajos hasta la fecha estudian la evolución de la AMR mediada por plásmidos directamente en cepas clínicas. Nuestros resultados muestran que, aunque la cepa de laboratorio *E. coli* J53 proporciona predicciones cualitativas razonablemente buenas de los efectos de los PV, los costes de *fitness*

asociados a los plásmidos tienden a ser mucho más altos que en las bacterias silvestres (Fig. 19 B y Fig. 21 B). Esta diferencia en el *fitness* podría verse reflejada en otros fenotipos como el de la resistencia y podría llevar a predicciones erróneas sobre la supervivencia de las cepas AMR en el intestino de los pacientes. Este efecto puede verse magnificado por la complejidad de la mayoría de las comunidades bacterianas. Por eso, tener en cuenta aspectos ecológicos y evolutivos en el estudio de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos, nos permitirá producir predicciones más precisas y ayudará a desarrollar mejores estrategias de intervención contra la AMR en entornos clínicos.

10 Conclusiones

Las conclusiones de esta tesis doctoral son las siguientes:

1. La transmisión entre pacientes de la resistencia a antibióticos carbapenémicos mediada por plásmidos pOXA-48 en el Hospital Universitario Ramón y Cajal durante los años 2014-2016 está principalmente mediada por clones de *Klebsiella pneumoniae* ST11 (y en menor medida ST307 y ST15) y esporádicamente por clones de *Escherichia coli* ST10.
2. Hemos detectado potenciales eventos de transmisión de la resistencia a antibióticos carbapenémicos mediada por cepas portadoras de plásmidos pOXA-48 en los servicios de neurología, gastroenterología, neumología y urología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. La transmisión ocurre (1) dentro de los servicios, destacando por el número de casos en el servicio de Neurología, y también (2) entre los servicios de neurología y gastroenterología y de neumología y urología.
3. Detectamos eventos de transferencia horizontal de plásmidos pOXA-48 en el intestino de pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Ramón y Cajal. Los datos sugieren que el plásmido se disemina de forma generalizada entre la microbiota del intestino de todos los pacientes colonizados.
4. Identificamos 35 variantes del plásmido pOXA-48 en la colección de 224 enterobacterias, aislados de 12 especies distintas. Una de las variantes (PV-I) fue la más representativa (identificada en el 67% de los casos).
5. Revelamos eventos de evolución *in vivo* en plásmidos pOXA-48 en el intestino de los pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Ramón y Cajal.
6. La evolución de los plásmidos pOXA-48 en el intestino de los pacientes da lugar a dos tipos de variantes: i) unas con una elevada resistencia, pero alto coste en el *fitness* en ausencia de antibióticos, y otras de baja resistencia y bajo coste. En este

escenario, la frecuencia de los tratamientos antibióticos determina la selección de estas variantes en la microbiota intestinal.

11 Bibliografía

1. Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 6578–6583 (1998).
2. Brocks, J. J., Logan, G. A., Buick, R. & Summons, R. E. Archean Molecular Fossils and the Early Rise of Eukaryotes. *Science (1979)* **285**, 1033–1036 (1999).
3. Battistuzzi, F. U., Feijao, A. & Hedges, S. B. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol Biol* **4**, 44 (2004).
4. Woolfson, A. Origins of life: An improbable journey. *Nature* **520**, 617–618 (2015).
5. Louca, S., Mazel, F., Doebeli, M. & Parfrey, L. W. A census-based estimate of Earth's bacterial and archaeal diversity. *PLoS Biol* **17**, e3000106 (2019).
6. Falkowski, P. G., Fenchel, T. & Delong, E. F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* **320**, 1034–9 (2008).
7. Giovannelli, D. *et al.* Insight into the evolution of microbial metabolism from the deep-branching bacterium, *Thermovibrio ammonificans*. *Elife* **6**, (2017).
8. Podar, P. T., Yang, Z., Björnsdóttir, S. H. & Podar, M. Comparative Analysis of Microbial Diversity Across Temperature Gradients in Hot Springs From Yellowstone and Iceland. *Front Microbiol* **11**, (2020).
9. González-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E. O., Amann, R. & Amils, R. Microbial Ecology of an Extreme Acidic Environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4853–4865 (2003).
10. Achberger, A. M. *et al.* Microbial Community Structure of Subglacial Lake Whillans, West Antarctica. *Front Microbiol* **7**, (2016).
11. Schirmer, B. E., Gugger, M. & Donoghue, P. C. J. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology* **58**, 769–785 (2015).
12. Kasting, J. F. What caused the rise of atmospheric O₂? *Chem Geol* **362**, 13–25 (2013).
13. McInerney, J. O., O'Connell, M. J. & Pisani, D. The hybrid nature of the Eukaryota and a consilient view of life on Earth. *Nat Rev Microbiol* **12**, 449–455 (2014).
14. Drew, G. C., Stevens, E. J. & King, K. C. Microbial evolution and transitions along the parasite–mutualist continuum. *Nat Rev Microbiol* **19**, 623–638 (2021).
15. Sachs, J. L., Skophammer, R. G. & Regus, J. U. Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 10800–10807 (2011).
16. Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R. & Missaoui, A. Current Progress in Nitrogen Fixing Plants and Microbiome Research. *Plants* **9**, 97 (2020).
17. Moreira, D., Zivanovic, Y., López-Archilla, A. I., Iniesto, M. & López-García, P. Reductive evolution and unique predatory mode in the CPR bacterium *Vampirococcus lugosii*. *Nat Commun* **12**, (2021).
18. Weinert, L. A., Araujo-Jnr, E. v., Ahmed, M. Z. & Welch, J. J. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**, (2015).
19. James M. Jay, Martin J. LOessner & David A. Golden. History of Microorganisms in Food. in *Modern Food Microbiology* 3–9 (Springer US, 2005). doi:10.1007/0-387-23413-6_1.

20. Mazhar, S. & Yasmeen, R. *Role of Microorganisms in Modern Food Industry*. <https://www.researchgate.net/publication/359349216> (2022).
21. Najafpour, G. D. Industrial Microbiology. in *Biochemical Engineering and Biotechnology* 1–13 (Elsevier, 2007). doi:10.1016/B978-044452845-2/50001-X.
22. Baeshen, N. A. *et al.* Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact* **13**, 141 (2014).
23. Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C. K. & Marx, H. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends Biotechnol* **35**, 756–769 (2017).
24. Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M.-A. & Roosens, N. H. C. Genetically Modified Micro-Organisms for Industrial Food Enzyme Production: An Overview. *Foods* **9**, 326 (2020).
25. Kawasaki, H. & Ueda, K. Microbial innovations in the world of food. *Biosci Biotechnol Biochem* **81**, 48–53 (2017).
26. Jones, C. & Holland, I. B. Role of the SulB (FtsZ) protein in division inhibition during the SOS response in Escherichia coli: FtsZ stabilizes the inhibitor SulA in maxicells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6045–9 (1985).
27. Pickar-Oliver, A. & Gersbach, C. A. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 490–507 (2019).
28. Zhu, H. *et al.* PCR past, present and future. *Biotechniques* **69**, 317–325 (2020).
29. Gilbert, J. A. *et al.* Current understanding of the human microbiome. *Nat Med* **24**, 392–400 (2018).
30. Manor, O. *et al.* Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nat Commun* **11**, 5206 (2020).
31. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* **164**, 337–340 (2016).
32. Ley, R. E. *et al.* Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science (1979)* **320**, 1647–1651 (2008).
33. Blaser, M. J. & Falkow, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat Rev Microbiol* **7**, 887–894 (2009).
34. Zeevi, D. *et al.* Structural variation in the gut microbiome associates with host health. *Nature* **568**, 43–48 (2019).
35. Oprea, M. *et al.* The seventh pandemic of cholera in Europe revisited by microbial genomics. *Nat Commun* **11**, 5347 (2020).
36. Parkhill, J. *et al.* Genome sequence of Yersinia pestis, the causative agent of plague. *Nature* **413**, 523–527 (2001).
37. Hutchings, M. I., Truman, A. W. & Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* **51**, 72–80 (2019).
38. Aminov, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbiol* **1**, (2010).
39. Hemminki, E. & Paakkulainen, A. The effect of antibiotics on mortality from infectious diseases in Sweden and Finland. *Am J Public Health* **66**, 1180–1184 (1976).
40. Katz, L. & Baltz, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol* **43**, 155–176 (2016).
41. Burnett-Boothroyd, S. C. & McCarthy, B. J. Antimicrobial treatments of textiles for hygiene and infection control applications: an industrial perspective. in *Textiles for*

- Hygiene and Infection Control* 196–209 (Elsevier, 2011). doi:10.1533/9780857093707.3.196.
42. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Glossary of Terms Related to Antibiotic Resistance: CDC. <https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html> (2019).
 43. Singleton, Paul. & Sainsbury, Diana. *Dictionary of microbiology and molecular biology*. (Wiley, 2006).
 44. Llor, C. & Bjerrum, L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf* **5**, 229–241 (2014).
 45. San Millan, A., Escudero, J. A., Gifford, D. R., Mazel, D. & MacLean, R. C. Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nat Ecol Evol* **1**, 0010 (2017).
 46. Cassini, A. *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* **19**, 56–66 (2019).
 47. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **399**, 629–655 (2022).
 48. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* **128**, 1037–1050 (2007).
 49. Watanabe, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev* **27**, 87–115 (1963).
 50. World Health Organization. *2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis*. (2022).
 51. Jonas Olga B. Irwin, Alec Berthe, Franck Cesar Jean Le Gall, Francois G. Marquez & Patricio V. *Drug-resistant Infections: A Threat to Our Economic Future (Vol. 2) : final report*. WorldBank <https://documents.worldbank.org/en/publication/documents-reports/documentdetail/323311493396993758/final-report> (2017).
 52. O'Neill J. *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations / the Review on Antimicrobial Resistance*. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf (2016).
 53. Nikaido, H. & Takatsuka, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1794**, 769–781 (2009).
 54. Breijyeh, Z., Jubeh, B. & Karaman, R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules* **25**, 1340 (2020).
 55. Drlica, K. & Malik, M. Fluoroquinolones: Action and Resistance. *Curr Top Med Chem* **3**, 249–282 (2003).
 56. Sawa, T., Kooguchi, K. & Moriyama, K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care* **8**, 13 (2020).
 57. Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. & Toussaint, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**, 722–732 (2005).

58. Soucy, S. M., Huang, J. & Gogarten, J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet* **16**, 472–482 (2015).
59. Gogarten, J. P. & Townsend, J. P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**, 679–687 (2005).
60. Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299–304 (2000).
61. Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology* **303**, 298–304 (2013).
62. Bennett, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* **153**, S347–S357 (2008).
63. San Millan, A. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends Microbiol* **26**, 978–985 (2018).
64. Rodríguez-Beltrán, J. *et al.* Multicopy plasmids allow bacteria to escape from fitness trade-offs during evolutionary innovation. *Nat Ecol Evol* **2**, 873–881 (2018).
65. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* **31**, (2018).
66. Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., León-Sampedro, R., MacLean, R. C. & San Millán, Á. Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* **19**, 347–359 (2021).
67. Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. & de la Cruz, F. Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**, 434–452 (2010).
68. Sheppard, A. E. *et al.* Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene *bla*_{KPC}. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 3767–3778 (2016).
69. Acman, M. *et al.* Role of mobile genetic elements in the global dissemination of the carbapenem resistance gene bla_{NDM}. *Nat Commun* **13**, 1131 (2022).
70. Upadhyay, S. *et al.* Genetic Environment of Plasmid Mediated CTX-M-15 Extended Spectrum Beta-Lactamases from Clinical and Food Borne Bacteria in North-Eastern India. *PLoS One* **10**, e0138056 (2015).
71. Miró, E. *et al.* Characterization of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Enterobacteriaceae* Clinical Strains and Characterization of the Plasmids Implicated in Their Diffusion. *Microbial Drug Resistance* **19**, 94–99 (2013).
72. Belaynehe, K. M., Shin, S. W., Hong-Tae, P. & Yoo, H. S. Occurrence of aminoglycoside-modifying enzymes among isolates of *Escherichia coli* exhibiting high levels of aminoglycoside resistance isolated from Korean cattle farms. *FEMS Microbiol Lett* **364**, (2017).
73. Carattoli, A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2227–2238 (2009).
74. Arredondo-Alonso, S. *et al.* Plasmids Shaped the Recent Emergence of the Major Nosocomial Pathogen *Enterococcus faecium*. *mBio* **11**, (2020).
75. Rozwandowicz, M. *et al.* Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **73**, 1121–1137 (2018).
76. Che, Y. *et al.* Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**, (2021).

77. von Wintersdorff, C. J. H. *et al.* Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* **7**, (2016).
78. Guglielmini, J., Quintais, L., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F. & Rocha, E. P. C. The Repertoire of ICE in Prokaryotes Underscores the Unity, Diversity, and Ubiquity of Conjugation. *PLoS Genet* **7**, e1002222 (2011).
79. Ares-Arroyo, M., Coluzzi, C. & Rocha, E. P. C. Towards solving the conundrum of plasmid mobility: networks of 1 functional dependencies shape plasmid transfer 2 3. *bioRxiv* (2022) doi:10.1101/2022.07.04.498229.
80. Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N. & Wuertz, S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol* **3**, 700–710 (2005).
81. Barry, K. E. *et al.* Don't overlook the little guy: An evaluation of the frequency of small plasmids co-conjugating with larger carbapenemase gene containing plasmids. *Plasmid* **103**, 1–8 (2019).
82. Ramsay, J. P. & Firth, N. Diverse mobilization strategies facilitate transfer of non-conjugative mobile genetic elements. *Curr Opin Microbiol* **38**, 1–9 (2017).
83. Clark, A. J. & Warren, G. J. Conjugal transmission of plasmids. *Annu Rev Genet* **13**, 99–125 (1979).
84. Humphrey, S. *et al.* Staphylococcal phages and pathogenicity islands drive plasmid evolution. *Nat Commun* **12**, 5845 (2021).
85. Erdmann, S., Tschitschko, B., Zhong, L., Raftery, M. J. & Cavicchioli, R. A plasmid from an Antarctic haloarchaeon uses specialized membrane vesicles to disseminate and infect plasmid-free cells. *Nat Microbiol* **2**, 1446–1455 (2017).
86. Abe, K., Nomura, N. & Suzuki, S. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* **96**, (2020).
87. Dubey, G. P. & Ben-Yehuda, S. Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication. *Cell* **144**, 590–600 (2011).
88. Byrd, A. L., Belkaid, Y. & Segre, J. A. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* **16**, 143–155 (2018).
89. Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Martinez, F. J. & Huffnagle, G. B. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol* **78**, 481–504 (2016).
90. Perez-Carrasco, V., Soriano-Lerma, A., Soriano, M., Gutiérrez-Fernández, J. & Garcia-Salcedo, J. A. Urinary Microbiome: Yin and Yang of the Urinary Tract. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, (2021).
91. Lewis, F. M. T., Bernstein, K. T. & Aral, S. O. Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases. *Obstetrics & Gynecology* **129**, 643–654 (2017).
92. Willis, J. R. & Gabaldón, T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms* **8**, 308 (2020).
93. Schmidt, T. S. B., Raes, J. & Bork, P. The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell* **172**, 1198–1215 (2018).
94. Nayfach, S., Shi, Z. J., Seshadri, R., Pollard, K. S. & Kyrpides, N. C. New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome. *Nature* **568**, 505–510 (2019).
95. Yatsunenko, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227 (2012).

96. Kurilshikov, A. *et al.* Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition. *Nat Genet* **53**, 156–165 (2021).
97. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220–230 (2012).
98. Donaldson, G. P., Lee, S. M. & Mazmanian, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* **14**, 20–32 (2016).
99. Eckburg, P. B. *et al.* Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science (1979)* **308**, 1635–1638 (2005).
100. Spor, A., Koren, O. & Ley, R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* **9**, 279–290 (2011).
101. Langille, M. G. *et al.* Microbial shifts in the aging mouse gut. *Microbiome* **2**, 50 (2014).
102. Nagpal, R. *et al.* Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging* **4**, 267–285 (2018).
103. Rothschild, D. *et al.* Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* **555**, 210–215 (2018).
104. David, L. A. *et al.* Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol* **15**, R89 (2014).
105. Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X. & Xiang, C. Human Intestinal Lumen and Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS One* **7**, e39743 (2012).
106. Zackular, J. P., Rogers, M. A. M., Ruffin, M. T. & Schloss, P. D. The Human Gut Microbiome as a Screening Tool for Colorectal Cancer. *Cancer Prevention Research* **7**, 1112–1121 (2014).
107. Sepich-Poore, G. D. *et al.* The microbiome and human cancer. *Science (1979)* **371**, (2021).
108. Mottawea, W. *et al.* Altered intestinal microbiota–host mitochondria crosstalk in new onset Crohn’s disease. *Nat Commun* **7**, 13419 (2016).
109. Morgan, X. C. *et al.* Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* **13**, R79 (2012).
110. Kootte, R. S. *et al.* Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab* **26**, 611–619.e6 (2017).
111. Chassaing, B., Raja, S. M., Lewis, J. D., Srinivasan, S. & Gewirtz, A. T. Colonic Microbiota Encroachment Correlates With Dysglycemia in Humans. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **4**, 205–221 (2017).
112. Org, E. *et al.* Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol* **18**, 70 (2017).
113. Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Sandhu, K., Peterson, V. & Dinan, T. G. The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol* **19**, 179–194 (2020).
114. Wilck, N. *et al.* Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature* **551**, 585–589 (2017).
115. Li, J. *et al.* Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome* **5**, 14 (2017).
116. Trøseid, M., Andersen, G. Ø., Broch, K. & Hov, J. R. The gut microbiome in coronary artery disease and heart failure: Current knowledge and future directions. *EBioMedicine* **52**, 102649 (2020).

117. Chunxi, L., Haiyue, L., Yanxia, L., Jianbing, P. & Jin, S. The Gut Microbiota and Respiratory Diseases: New Evidence. *J Immunol Res* **2020**, 1–12 (2020).
118. Isles, N. S., Mu, A., Kwong, J. C., Howden, B. P. & Stinear, T. P. Gut microbiome signatures and host colonization with multidrug-resistant bacteria. *Trends Microbiol* (2022) doi:10.1016/j.tim.2022.01.013.
119. Panwar, R. B., Sequeira, R. P. & Clarke, T. B. Microbiota-mediated protection against antibiotic-resistant pathogens. *Genes Immun* **22**, 255–267 (2021).
120. Wilcox, M. H. Clostridium difficile infection and pseudomembranous colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**, 475–493 (2003).
121. Avis, T., Wilson, F. X., Khan, N., Mason, C. S. & Powell, D. J. Targeted microbiome-sparing antibiotics. *Drug Discov Today* **26**, 2198–2203 (2021).
122. Stracy, M. *et al.* Minimizing treatment-induced emergence of antibiotic resistance in bacterial infections. *Science (1979)* **375**, 889–894 (2022).
123. Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A. & Bruns, T. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Digestive Diseases* **34**, 260–268 (2016).
124. Blake, D. P., Hillman, K., Fenlon, D. R. & Low, J. C. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *J Appl Microbiol* **95**, 428–436 (2003).
125. Hu, Y. *et al.* Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat Commun* **4**, 2151 (2013).
126. Sommer, M. O. A., Dantas, G. & Church, G. M. Functional Characterization of the Antibiotic Resistance Reservoir in the Human Microflora. *Science (1979)* **325**, 1128–1131 (2009).
127. Stecher, B. *et al.* Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal *Enterobacteriaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 1269–1274 (2012).
128. McInnes, R. S., McCallum, G. E., Lamberte, L. E. & van Schaik, W. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Curr Opin Microbiol* **53**, 35–43 (2020).
129. Locey, K. J. & Lennon, J. T. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 5970–5975 (2016).
130. Janda, J. M. & Abbott, S. L. The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: “ *Enterobacterales* ”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clin Microbiol Rev* **34**, 46–76 (2021).
131. Huttenhower, C. *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).
132. CDC Division of Healthcare Quality Promotion, N. C. for E. and Z. I. D. *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532> (2019) doi:10.15620/cdc:82532.
133. Paterson, D. L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med* **119**, S20–S28 (2006).
134. Delgado-Valverde, M., Sojo-Dorado, J., Pascual, Á. & Rodríguez-Baño, J. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Ther Adv Infect Dis* **1**, 49–69 (2013).
135. Vardakas, K. Z., Tansarli, G. S., Rafailidis, P. I. & Falagas, M. E. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae

- producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**, 2793–2803 (2012).
136. Paterson, D. L. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* **6**, 460–3 (2000).
 137. Perez, F. & van Duin, D. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a menace to our most vulnerable patients. *Cleve Clin J Med* **80**, 225–33 (2013).
 138. McKenna, M. Antibiotic resistance: The last resort. *Nature* **499**, 394–396 (2013).
 139. Pitout, J. D. D., Nordmann, P. & Poirel, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 5873–5884 (2015).
 140. Decré, D. *et al.* Emerging Severe and Fatal Infections Due to *Klebsiella pneumoniae* in Two University Hospitals in France. *J Clin Microbiol* **49**, 3012–3014 (2011).
 141. Capone, A. *et al.* High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clinical Microbiology and Infection* **19**, E23–E30 (2013).
 142. Sheu, C.-C., Chang, Y.-T., Lin, S.-Y., Chen, Y.-H. & Hsueh, P.-R. Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options. *Front Microbiol* **10**, (2019).
 143. Kulengowski, B., Ribes, J. A. & Burgess, D. S. Polymyxin B Etest® compared with gold-standard broth microdilution in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae exhibiting a wide range of polymyxin B MICs. *Clinical Microbiology and Infection* **25**, 92–95 (2019).
 144. Salomão, M. C. *et al.* Increased Risk for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Colonization in Intensive Care Units after Hospitalization in Emergency Department. *Emerg Infect Dis* **26**, 1156–1163 (2020).
 145. Yi, J. & Kim, K.-H. Identification and infection control of carbapenem-resistant Enterobacteriales in intensive care units. *Acute and Critical Care* **36**, 175–184 (2021).
 146. Dickstein, Y. *et al.* Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization and infection in critically ill patients: a retrospective matched cohort comparison with non-carriers. *Journal of Hospital Infection* **94**, 54–59 (2016).
 147. Centers for Disease Control and Prevention, N. C. for E. and Z. I. D. (NCEZID), D. of H. Q. P. (DHQP). CRE Technical Information CDC. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html#> (2019) doi:<https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html#>.
 148. Aurilio, C. *et al.* Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030421> (2022).
 149. Essack, S. Y. The Development of β -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of Beta-Lactamases. *Pharmaceutical Research* **18**, 1391–1399 (2001).
 150. Egan, A. J. F., Errington, J. & Vollmer, W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat Rev Microbiol* **18**, 446–460 (2020).
 151. Chung, H. S. *et al.* Rapid β -lactam-induced lysis requires successful assembly of the cell division machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 21872–21877 (2009).
 152. Wong, F. *et al.* Understanding Beta-Lactam-Induced Lysis at the Single-Cell Level. *Front Microbiol* **12**, (2021).

153. Ghai, I. & Ghai, S. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infect Drug Resist* **Volume 11**, 523–530 (2018).
154. Jacoby, G. A. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **22**, 161–82, Table of Contents (2009).
155. Davies, T. A., Shang, W., Bush, K. & Flamm, R. K. Affinity of Doripenem and Comparators to Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1510–1512 (2008).
156. Hashizume, T., Ishino, F., Nakagawa, J., Tamaki, S. & Matsuhashi, M. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: Binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot (Tokyo)* **37**, 394–400 (1984).
157. Bonomo, R. A. *et al.* Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis* **66**, 1290–1297 (2018).
158. Matsumura, Y. & Pitout, J. D. Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Expert Rev Mol Diagn* **16**, 783–794 (2016).
159. Queenan, A. M. & Bush, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**, 440–458 (2007).
160. Deshpande, L. M., Rhomberg, P. R., Sader, H. S. & Jones, R. N. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: Report from the MYSTIC Program (1999–2005). *Diagn Microbiol Infect Dis* **56**, 367–372 (2006).
161. Nordmann, P., Naas, T. & Poirel, L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* **17**, 1791–1798 (2011).
162. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L. & Nordmann, P. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev* **18**, 306–325 (2005).
163. Walther-Rasmussen, J. & Høiby, N. OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**, 373–383 (2006).
164. Poirel, L., Naas, T. & Nordmann, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 24–38 (2010).
165. Antunes, N. & Fisher, J. Acquired Class D β -Lactamases. *Antibiotics* **3**, 398–434 (2014).
166. Evans, B. A. & Amyes, S. G. B. OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* **27**, 241–263 (2014).
167. Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K. A. & Matsumura, Y. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 33 Preprint at <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19> (2020).
168. Mathers, A. J. *et al.* Molecular Dissection of an Outbreak of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Reveals Intergenous KPC Carbapenemase Transmission through a Promiscuous Plasmid. *mBio* **2**, (2011).
169. David, S. *et al.* Integrated chromosomal and plasmid sequence analyses reveal diverse modes of carbapenemase gene spread among *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 25043–25054 (2020).
170. Karlowsky, J. A. *et al.* *In Vitro* Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae Isolates Collected by the SMART Global Surveillance Program from 2008 to 2014. *J Clin Microbiol* **55**, 1638–1649 (2017).

171. de Jonge, B. L. M. *et al.* *In Vitro* Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam of Carbapenem-Nonsusceptible Enterobacteriaceae Isolates Collected during the INFORM Global Surveillance Study (2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 3163–3169 (2016).
172. Hernández-García, M. *et al.* Characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from colonized patients in a university hospital in Madrid, Spain, during the R-GNOSIS project depicts increased clonal diversity over time with maintenance of high-risk clones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **73**, 3039–3043 (2018).
173. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V. & Nordmann, P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 15–22 (2004).
174. Carrër, A. *et al.* Spread of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2950–2954 (2008).
175. Gülmez, D. *et al.* Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* **31**, 523–526 (2008).
176. Cuzon, G. *et al.* Plasmid-Encoded Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase OXA-48 in an Imipenem-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* Strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3463–3464 (2008).
177. Carrër, A. *et al.* Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 1369–1373 (2010).
178. Matar, G. M. *et al.* Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* that produce extended spectrum β -lactamase. *Ann Trop Med Parasitol* **104**, 271–274 (2010).
179. Decre, D. *et al.* Possible importation and subsequent cross-transmission of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2010. *Eurosurveillance* **15**, 1 (2010).
180. Cuzon, G., Naas, T., Lesenne, A., Benhamou, M. & Nordmann, P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents* **36**, 91–93 (2010).
181. Benouda, A., Touzani, O., Khairallah, M.-T., Araj, G. F. & Matar, G. M. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann Trop Med Parasitol* **104**, 327–330 (2010).
182. Moquet, O. *et al.* Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant Enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis* **17**, 143–144 (2011).
183. Kalpoe, J. S., al Naiemi, N., Poirel, L. & Nordmann, P. Detection of an Ambler class D OXA-48-type β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in The Netherlands. *J Med Microbiol* **60**, 677–678 (2011).
184. Pitart, C. *et al.* First Outbreak of a Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing OXA-48 β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 4398–4401 (2011).
185. Rivera-Izquierdo, M. *et al.* OXA-48 Carbapenemase-Producing Enterobacteriales in Spanish Hospitals: An Updated Comprehensive Review on a Rising Antimicrobial Resistance. *Antibiotics* **10**, 89 (2021).
186. O'Brien, D. J. *et al.* First isolation and outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in an Irish hospital, March to June 2011. *Eurosurveillance* **16**, (2011).

187. Goren, M. G., Chmelnitsky, I., Carmeli, Y. & Navon-Venezia, S. Plasmid-encoded OXA-48 carbapenemase in *Escherichia coli* from Israel. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66**, 672–673 (2011).
188. Pirš, M. *et al.* A case of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred to Slovenia from Libya, November 2011. *Euro Surveill* **16**, 20042 (2011).
189. Woerther, P.-L. *et al.* A Long-Term Study of the Diversity of OXA-48-Like Carbapenemase-Producing Bacterial Strains in Infected Patients and Carriers. *Microbial Drug Resistance* **24**, 181–189 (2018).
190. David, S. *et al.* Genomic surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella* in Wales reveals persistent spread of *K. pneumoniae* ST307 and adaptive 2 evolution of pOXA-48-like plasmids. doi:10.1101/2022.05.25.492139.
191. Poirel, L., Bonnin, R. A. & Nordmann, P. Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 559–562 (2012).
192. Poirel, L., Héritier, C. & Nordmann, P. Chromosome-Encoded Ambler Class D β -Lactamase of *Shewanella oneidensis* as a Progenitor of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 348–351 (2004).
193. Zong, Z. Discovery of blaOXA-199, a Chromosome-Based blaOXA-48-Like Variant, in *Shewanella xiamenensis*. *PLoS One* **7**, e48280 (2012).
194. Skalova, A. *et al.* Molecular Characterization of OXA-48-Like-Producing Enterobacteriaceae in the Czech Republic and Evidence for Horizontal Transfer of pOXA-48-Like Plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* **61**, (2017).
195. Beyrouthy, R. *et al.* IS1R-mediated plasticity of IncL/M plasmids leads to the insertion of bla OXA-48 into the *Escherichia coli* Chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 3785–90 (2014).
196. Kumwenda, G. P. *et al.* Genomic features of plasmids coding for KPC-2, NDM-5 or OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae from Malawi. *J Antimicrob Chemother* **76**, 267–270 (2021).
197. Sattler, J. *et al.* Emergence of Tn 1999.7, a New Transposon in bla_{OXA-48}-Harboring Plasmids Associated with Increased Plasmid Stability. *Antimicrob Agents Chemother* (2022) doi:10.1128/aac.00787-22.
198. Carattoli, A. *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**, 219–228 (2005).
199. Redondo-Salvo, S. *et al.* Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nat Commun* **11**, 3602 (2020).
200. Carattoli, A., Seiffert, S. N., Schwendener, S., Perreten, V. & Endimiani, A. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS One* **10**, e0123063 (2015).
201. Gijón, D. *et al.* Early OXA-48-Producing Enterobacterales Isolates Recovered in a Spanish Hospital Reveal a Complex Introduction Dominated by Sequence Type 11 (ST11) and ST405 *Klebsiella pneumoniae* Clones. *mSphere* **5**, (2020).
202. Mierzejewska, J., Kulińska, A. & Jagura-Burdzy, G. Functional analysis of replication and stability regions of broad-host-range conjugative plasmid CTX-M3 from the IncL/M incompatibility group. *Plasmid* **57**, 95–107 (2007).

203. Potron, A., Poirel, L. & Nordmann, P. Derepressed Transfer Properties Leading to the Efficient Spread of the Plasmid Encoding Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 467–471 (2014).
204. San Millan, A. *et al.* Small-Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance Is Enhanced by Increases in Plasmid Copy Number and Bacterial Fitness. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 3335–3341 (2015).
205. Simonsen, L. The existence conditions for bacterial plasmids: Theory and reality. *Microb Ecol* **22**, 187–205 (1991).
206. Stewart, F. M. & Levin, B. R. The Population Biology of Bacterial Plasmids: A PRIORI Conditions for the Existence of Conjugationally Transmitted Factors. *Genetics* **87**, 209–28 (1977).
207. Bergstrom, C. T., Lipsitch, M. & Levin, B. R. Natural Selection, Infectious Transfer and the Existence Conditions for Bacterial Plasmids. *Genetics* **155**, 1505–1519 (2000).
208. Baltrus, D. A. Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends Ecol Evol* **28**, 489–495 (2013).
209. Salje, J. Plasmid segregation: how to survive as an extra piece of DNA. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**, 296–317 (2010).
210. Reyes-Lamothe, R. *et al.* High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division. *Nucleic Acids Res* **42**, 1042–1051 (2014).
211. Díaz-Orejas, R., Espinosa, M. & Yeo, C. C. The Importance of the Expendable: Toxin–Antitoxin Genes in Plasmids and Chromosomes. *Front Microbiol* **8**, (2017).
212. Gerdes, K., Rasmussen, P. B. & Molin, S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 3116–3120 (1986).
213. Stalder, T. *et al.* Emerging patterns of plasmid–host coevolution that stabilize antibiotic resistance. *Sci Rep* **7**, 4853 (2017).
214. van Melderen, L. & Saavedra De Bast, M. Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? *PLoS Genet* **5**, e1000437 (2009).
215. Jaskólska, M., Adams, D. W. & Blokesch, M. Two defence systems eliminate plasmids from seventh pandemic *Vibrio cholerae*. *Nature* **604**, 323–329 (2022).
216. Pinilla-Redondo, R. *et al.* Type IV CRISPR–Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. *Nucleic Acids Res* **48**, 2000–2012 (2020).
217. Kuzmenko, A. *et al.* DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease. *Nature* **587**, 632–637 (2020).
218. Doron, S. *et al.* Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science (1979)* **359**, (2018).
219. MacLean, R. C. & San Millan, A. Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox. *Current Biology* **25**, R764–R767 (2015).
220. Brockhurst, M. A. & Harrison, E. Ecological and evolutionary solutions to the plasmid paradox. *Trends Microbiol* **30**, 534–543 (2022).
221. Harrison, E. & Brockhurst, M. A. Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol* **20**, 262–267 (2012).
222. Ilangovan, A., Connery, S. & Waksman, G. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends Microbiol* **23**, 301–310 (2015).

223. Turner, P. E., Cooper, V. S. & Lenski, R. E. Trade-off between horizontal and vertical modes of transmission in bacterial plasmids. *Evolution (N Y)* **52**, 315–329 (1998).
224. Vielmetter, W., Bonhoeffer, F. & Schütte, A. Genetic evidence for transfer of a single DNA strand during bacterial conjugation. *J Mol Biol* **37**, 81–86 (1968).
225. Baharoglu, Z., Bikard, D. & Mazel, D. Conjugative DNA Transfer Induces the Bacterial SOS Response and Promotes Antibiotic Resistance Development through Integron Activation. *PLoS Genet* **6**, e1001165 (2010).
226. Petrova, V., Chitteni-Pattu, S., Drees, J. C., Inman, R. B. & Cox, M. M. An SOS Inhibitor that Binds to Free RecA Protein: The PsiB Protein. *Mol Cell* **36**, 121–130 (2009).
227. León-Sampedro, R., Novais, C., Peixe, L., Baquero, F. & Coque, T. M. Diversity and Evolution of the Tn5801-tet(M)-Like Integrative and Conjugative Elements among Enterococcus, Streptococcus, and Staphylococcus. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 1736–46 (2016).
228. Johnson, C. M. & Grossman, A. D. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu Rev Genet* **49**, 577–601 (2015).
229. Roberts, A. P. & Mullany, P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol* **17**, 251–258 (2009).
230. Rodríguez-Beltrán, J. *et al.* Translational demand is not a major source of plasmid-associated fitness costs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **377**, 20200463 (2022).
231. Sorek, R. *et al.* Genome-Wide Experimental Determination of Barriers to Horizontal Gene Transfer. *Science (1979)* **318**, 1449–1452 (2007).
232. Plotkin, J. B. & Kudla, G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* **12**, 32–42 (2011).
233. Nguyen, T. N. M., Phan, Q. G., Duong, L. P., Bertrand, K. P. & Lenski, R. E. Effects of carriage and expression of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of Escherichia coli K12. *Mol Biol Evol* **6**, 213–225 (1989).
234. San Millan, A. & MacLean, R. C. Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).
235. Lili, L. N., Britton, N. F. & Feil, E. J. The Persistence of Parasitic Plasmids. *Genetics* **177**, 399–405 (2007).
236. Lopatkin, A. J. *et al.* Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nat Commun* **8**, 1689 (2017).
237. Stevenson, C., Hall, J. P., Harrison, E., Wood, A. J. & Brockhurst, M. A. Gene mobility promotes the spread of resistance in bacterial populations. *ISME J* **11**, 1930–1932 (2017).
238. Stevenson, C., Hall, J. P. J., Brockhurst, M. A. & Harrison, E. Plasmid stability is enhanced by higher-frequency pulses of positive selection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **285**, 20172497 (2018).
239. Hall, J. P. J., Wood, A. J., Harrison, E. & Brockhurst, M. A. Source–sink plasmid transfer dynamics maintain gene mobility in soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 8260–8265 (2016).
240. Loftie-Eaton, W. *et al.* Compensatory mutations improve general permissiveness to antibiotic resistance plasmids. *Nat Ecol Evol* 1–10 (2017) doi:10.1038/s41559-017-0243-2.
241. Carrilero, L., Dunn, S., McNally, A. & Brockhurst, M. Evolutionary responses to acquiring a multidrug resistance plasmid are dominated by 1 metabolic functions

- across diverse *Escherichia coli* lineages. *bioRxiv* (2022) doi:10.1101/2022.07.22.501110.
242. Porse, A., Schønning, K., Munck, C. & Sommer, M. O. A. Survival and Evolution of a Large Multidrug Resistance Plasmid in New Clinical Bacterial Hosts. *Mol Biol Evol* **33**, 2860–2873 (2016).
 243. Harrison, E. *et al.* Bacteriophages limit the existence conditions for conjugative plasmids. *mBio* **6**, e00586 (2015).
 244. Carrilero, L. *et al.* Positive Selection Inhibits Plasmid Coexistence in Bacterial Genomes. *mBio* **12**, (2021).
 245. San Millan, A., Heilbron, K. & MacLean, R. C. Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. *ISME J* **8**, 601–612 (2014).
 246. Harrison, E., Guymer, D., Spiers, A. J., Paterson, S. & Brockhurst, M. A. Parallel Compensatory Evolution Stabilizes Plasmids across the Parasitism-Mutualism Continuum. *Current Biology* **25**, 2034–2039 (2015).
 247. Millan, A. S. *et al.* Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nat Commun* **5**, 5208 (2014).
 248. Sota, M. *et al.* Shifts in the host range of a promiscuous plasmid through parallel evolution of its replication initiation protein. *ISME J* **4**, 1568–1580 (2010).
 249. Hall, J. P. J., Wright, R. C. T., Guymer, D., Harrison, E. & Brockhurst, M. A. Extremely fast amelioration of plasmid fitness costs by multiple functionally diverse pathways. *Microbiology (N Y)* **166**, 56–62 (2020).
 250. Loftie-Eaton, W. *et al.* Evolutionary Paths That Expand Plasmid Host-Range: Implications for Spread of Antibiotic Resistance. *Mol Biol Evol* **33**, 885–97 (2016).
 251. Modi, R. I., Wilke, C. M., Rosenzweig, R. F. & Adams, J. Plasmid macro-evolution: selection of deletions during adaptation in a nutrient-limited environment. *Genetica* **84**, 195–202 (1991).
 252. Lee, M.-C. & Marx, C. J. Repeated, Selection-Driven Genome Reduction of Accessory Genes in Experimental Populations. *PLoS Genet* **8**, e1002651 (2012).
 253. Fernandez-Lopez, R., del Campo, I., Revilla, C., Cuevas, A. & de la Cruz, F. Negative Feedback and Transcriptional Overshooting in a Regulatory Network for Horizontal Gene Transfer. *PLoS Genet* **10**, e1004171 (2014).
 254. Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K. & Koraimann, G. Expression and assembly of a functional type IV secretion system elicit extracytoplasmic and cytoplasmic stress responses in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 6611–21 (2006).
 255. Hall, J. P. J. *et al.* Plasmid fitness costs are caused by specific genetic conflicts enabling resolution by compensatory mutation. *PLoS Biol* **19**, e3001225 (2021).
 256. Zwanzig, M. *et al.* Mobile Compensatory Mutations Promote Plasmid Survival. *mSystems* **4**, (2019).
 257. Prenskey, H., Gomez-Simmonds, A., Uhlemann, A. & Lopatkin, A. J. Conjugation dynamics depend on both the plasmid acquisition cost and the fitness cost. *Mol Syst Biol* **17**, (2021).
 258. Alonso-del Valle, A. *et al.* Variability of plasmid fitness effects contributes to plasmid persistence in bacterial communities. *Nat Commun* **12**, 2653 (2021).
 259. Rodríguez-Beltrán, J. *et al.* Genetic dominance governs the evolution and spread of mobile genetic elements in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 15755–15762 (2020).

260. de Gelder, L., Ponciano, J. M., Joyce, P. & Top, E. M. Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology (Reading)* **153**, 452–463 (2007).
261. Kottara, A., Hall, J. P. J., Harrison, E. & Brockhurst, M. A. Variable plasmid fitness effects and mobile genetic element dynamics across *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol Ecol* **94**, (2018).
262. Dunn, S., Carrilero, L., Brockhurst, M., McNally, A. & Baltrus, D. *Limited and Strain-Specific Transcriptional and Growth Responses to Acquisition of a Multidrug Resistance Plasmid in Genetically Diverse Escherichia coli Lineages*. <https://doi.org/10> (2021).
263. Sheppard, R. J., Beddis, A. E. & Barraclough, T. G. The role of hosts, plasmids and environment in determining plasmid transfer rates: A meta-analysis. *Plasmid* **108**, 102489 (2020).
264. Gama, J. A., Kloos, J., Johnsen, P. J. & Samuelsen, Ø. Host dependent maintenance of a bla_{NDM-1}-encoding plasmid in clinical *Escherichia coli* isolates. *Sci Rep* **10**, 9332 (2020).
265. Alderliesten, J. B. *et al.* Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: a meta-analysis. *BMC Microbiol* **20**, 135 (2020).
266. Kloos, J., Gama, J. A., Hegstad, J., Samuelsen, Ø. & Johnsen, P. J. Piggybacking on Niche Adaptation Improves the Maintenance of Multidrug-Resistance Plasmids. *Mol Biol Evol* **38**, 3188–3201 (2021).
267. Pinilla-Redondo, R., Cyriaque, V., Jacquiod, S., Sørensen, S. J. & Riber, L. Monitoring plasmid-mediated horizontal gene transfer in microbiomes: recent advances and future perspectives. *Plasmid* **99**, 56–67 (2018).
268. Engler, C., Kandzia, R. & Marillonnet, S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS One* **3**, e3647 (2008).
269. Poirel, L., Potron, A. & Nordmann, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* **67**, 1597–606 (2012).
270. León-Sampedro, R. *et al.* Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nat Microbiol* **6**, 606–616 (2021).
271. DelaFuente, J. *et al.* Within-patient evolution of plasmid-mediated antimicrobial resistance. *Nat Ecol Evol* (2022) doi:10.1038/s41559-022-01908-7.
272. Yang, J. *et al.* High-Efficiency Scarless Genetic Modification in *Escherichia coli* by Using Lambda Red Recombination and I-SceI Cleavage. *Appl Environ Microbiol* **80**, 3826–3834 (2014).
273. Vincent, J.-L. *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**, 2323–9 (2009).
274. Snitkin, E. S. *et al.* Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* **4**, 148ra116 (2012).
275. David, S. *et al.* Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol* **4**, 1919–1929 (2019).
276. Conlan, S. *et al.* Plasmid Dissemination and Selection of a Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain during Transplant-Associated Antibiotic Therapy. *mBio* **10**, (2019).

277. Conlan, S. *et al.* Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Transl Med* **6**, (2014).
278. Pecora, N. D. *et al.* Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in a Health Care System. *mBio* **6**, e01030 (2015).
279. Potron, A., Poirel, L., Rondinaud, E. & Nordmann, P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Eurosurveillance* **18**, (2013).
280. Paño-Pardo, J. R. *et al.* Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother* **68**, 89–96 (2013).
281. Hidalgo, L. *et al.* Sequence-based epidemiology of an OXA-48 plasmid during a hospital outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* (2019) doi:10.1128/AAC.01204-19.
282. Ledda, A. *et al.* Hospital outbreak of carbapenem-resistant Enterobacterales associated with a bla OXA-48 plasmid carried mostly by *Escherichia coli* ST399. *Microb Genom* **8**, (2022).
283. Göttig, S., Gruber, T. M., Stecher, B., Wichelhaus, T. A. & Kempf, V. A. J. In vivo horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. *Clin Infect Dis* **60**, 1808–15 (2015).
284. Guo, L. *et al.* Nosocomial Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal Transmission of ST147 and ST383. *PLoS One* **11**, e0160754 (2016).
285. Haverkate, M. R. *et al.* Within-Host and Population Transmission of blaOXA-48 in *K. pneumoniae* and *E. coli*. *PLoS One* **10**, e0140960 (2015).
286. Hernández-García, M. *et al.* Intestinal co-colonization with different carbapenemase-producing Enterobacterales isolates is not a rare event in an OXA-48 endemic area. *EClinicalMedicine* **15**, 72–79 (2019).
287. Maechler, F. *et al.* Contact isolation versus standard precautions to decrease acquisition of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacterales in non-critical care wards: a cluster-randomised crossover trial. *Lancet Infect Dis* **20**, 575–584 (2020).
288. Díaz-Agero Pérez, C. *et al.* Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: a prevalence survey in a Spanish University Hospital. *BMJ Open* **9**, e024879 (2019).
289. Ondov, B. D. *et al.* Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol* **17**, 132 (2016).
290. Katz, L. *et al.* Mashtree: a rapid comparison of whole genome sequence files. *J Open Source Softw* **4**, 1762 (2019).
291. Croucher, N. J. *et al.* Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res* **43**, e15–e15 (2015).
292. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol* **32**, 268–274 (2015).

293. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* **49**, W293–W296 (2021).
294. Maiden, M. C. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3140–5 (1998).
295. de Maio, N., Wu, C.-H. & Wilson, D. J. SCOTTI: Efficient Reconstruction of Transmission within Outbreaks with the Structured Coalescent. *PLoS Comput Biol* **12**, e1005130 (2016).
296. Sullivan, M. J., Petty, N. K. & Beatson, S. A. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* **27**, 1009–1010 (2011).
297. Matsumura, Y., Peirano, G. & Pitout, J. D. D. Complete Genome Sequence of Escherichia coli J53, an Azide-Resistant Laboratory Strain Used for Conjugation Experiments. *Genome Announc* **6**, (2018).
298. del Campo, I. *et al.* Determination of conjugation rates on solid surfaces. *Plasmid* **67**, 174–182 (2012).
299. Lu, M.-C. *et al.* Transmission and evolution of OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae ST11 in a single hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* **75**, 318–326 (2020).
300. Dmowski, M., Gołębiewski, M. & Kern-Zdanowicz, I. Characteristics of the Conjugative Transfer System of the IncM Plasmid pCTX-M3 and Identification of Its Putative Regulators. *J Bacteriol* **200**, (2018).
301. Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B. & Bajaj, J. S. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* **30**, 332–338 (2014).
302. Chang, D.-E. *et al.* Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 7427–7432 (2004).
303. van Schaik, W. The human gut resistome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**, 20140087 (2015).
304. Dimitriu, T., Matthews, A. C. & Buckling, A. Increased copy number couples the evolution of plasmid horizontal transmission and plasmid-encoded antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**, e2107818118 (2021).
305. Wheatley, R. *et al.* Rapid evolution and host immunity drive the rise and fall of carbapenem resistance during an acute *Pseudomonas aeruginosa* infection. doi:10.1038/s41467-021-22814-9.
306. Fröhlich, C. *et al.* Cryptic β -Lactamase Evolution Is Driven by Low β -Lactam Concentrations. *mSphere* **6**, (2021).
307. Souque, C., Escudero, J. A. & MacLean, R. C. Integron activity accelerates the evolution of antibiotic resistance. *Elife* **10**, (2021).
308. Bottery, M. J., Wood, A. J. & Brockhurst, M. A. Adaptive modulation of antibiotic resistance through intragenomic coevolution. *Nat Ecol Evol* **1**, 1364–1369 (2017).
309. Vogwill, T. & MacLean, R. C. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evol Appl* **8**, 284–295 (2015).
310. Rajer, F. & Sandegren, L. The Role of Antibiotic Resistance Genes in the Fitness Cost of Multiresistance Plasmids. *mBio* **13**, e0355221 (2022).
311. Humphrey, B. *et al.* Fitness of *Escherichia coli* strains carrying expressed and partially silent IncN and IncP1 plasmids. *BMC Microbiol* **12**, 1–9 (2012).

312. Andersson, D. I. & Hughes, D. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* vol. 8 260–271 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319> (2010).
313. Basra, P. *et al.* Fitness Tradeoffs of Antibiotic Resistance in Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. *Genome Biol Evol* **10**, 667–679 (2018).
314. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410 (1990).
315. Alikhan, N. F., Petty, N. K., ben Zakour, N. L. & Beatson, S. A. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* **12**, 1–10 (2011).
316. Fournet-Fayard, S., Joly, B. & Forestier, C. Transformation of wild type Klebsiella pneumoniae with plasmid DNA by electroporation. *J Microbiol Methods* **24**, 49–54 (1995).
317. Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A. & Korobeynikov, A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics* **70**, (2020).
318. Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D. & Gurevich, A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* **34**, i142–i150 (2018).
319. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**, 2068–2069 (2014).
320. Deatherage, D. E. & Barrick, J. E. Identification of mutations in laboratory evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol* **1151**, 165 (2014).
321. Carattoli, A. *et al.* In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 3895–3903 (2014).
322. Zankari, E. *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**, 2640–2644 (2012).
323. Garcillán-Barcia, M. P. & de la Cruz, F. Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* **60**, 1–18 (2008).
324. DelaFuente, J., Rodriguez-Beltran, J. & San Millan, A. Methods to Study Fitness and Compensatory Adaptation in Plasmid-Carrying Bacteria. *Methods in Molecular Biology* **2075**, 371–382 (2020).
325. Fan, Y. *et al.* YbdO Promotes the Pathogenicity of Escherichia coli K1 by Regulating Capsule Synthesis. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
326. Millan, A. S. *et al.* Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 3335–3341 (2015).
327. Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* **13**, e1005595 (2017).
328. Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y. & Pevzner, P. A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology* 2019 37:5 **37**, 540–546 (2019).
329. Wick, R. R., Schultz, M. B., Zobel, J. & Holt, K. E. Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics* **31**, 3350–3352 (2015).
330. Walker, B. J. *et al.* Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS One* **9**, e112963 (2014).

331. Hunt, M. *et al.* Circlator: Automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. *Genome Biol* **16**, 1–10 (2015).
332. Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* **29**, 24–26 (2011).
333. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
334. Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* **34**, 3094–3100 (2018).
335. Tatusova, T. *et al.* NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* **44**, 6614–6624 (2016).
336. Yurtsev, E. A., Chao, H. X., Datta, M. S., Artemova, T. & Gore, J. Bacterial cheating drives the population dynamics of cooperative antibiotic resistance plasmids. *Mol Syst Biol* **9**, (2013).
337. Lloyd-Smith, J. O., Schreiber, S. J., Kopp, P. E. & Getz, W. M. Superspreading and the effect of individual variation on disease emergence. *Nature* **438**, 355–359 (2005).
338. Cerqueira, G. C. *et al.* Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 1135–1140 (2017).
339. Munoz-Price, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* **13**, 785–96 (2013).
340. Mathers, A. J. *et al.* Intensive Care Unit Wastewater Interventions to Prevent Transmission of Multispecies *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Organisms. *Clin Infect Dis* **67**, 171–178 (2018).
341. Decraene, V. *et al.* A Large, Refractory Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Demonstrates Carbapenemase Gene Outbreaks Involving Sink Sites Require Novel Approaches to Infection Control. *Antimicrob Agents Chemother* **62**, (2018).
342. Kizny Gordon, A. E. *et al.* The Hospital Water Environment as a Reservoir for Carbapenem-Resistant Organisms Causing Hospital-Acquired Infections—A Systematic Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases* **64**, 1435–1444 (2017).
343. Chng, K. R. *et al.* Cartography of opportunistic pathogens and antibiotic resistance genes in a tertiary hospital environment. *Nat Med* **26**, 941–951 (2020).
344. Getino, M. & de la Cruz, F. Natural and Artificial Strategies To Control the Conjugative Transmission of Plasmids. *Microbiol Spectr* **6**, (2018).
345. Herencias, C. *et al.* Collateral sensitivity associated with antibiotic resistance plasmids. *Elife* **10**, 1–13 (2021).
346. López-Igual, R., Bernal-Bayard, J., Rodríguez-Patón, A., Ghigo, J. M. & Mazel, D. Engineered toxin–intein antimicrobials can selectively target and kill antibiotic-resistant bacteria in mixed populations. *Nat Biotechnol* **37**, 755–760 (2019).
347. zur Wiesch, P. A., Kouyos, R., Engelstädter, J., Regoes, R. R. & Bonhoeffer, S. Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* **11**, 236–247 (2011).
348. Santos-Lopez, A. *et al.* The roles of history, chance, and natural selection in the evolution of antibiotic resistance. *Elife* **10**, (2021).

12 Anexo

12.1 Tabla Anexo 1. Descripción las cepas clínicas aisladas en el Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Datos obtenidos de las citas^{270,271}. En la tabla NA indica datos desconocidos. En la columna Aislado las siguientes abreviaturas corresponden a: C. amalonaticus a *Citrobacter amalonaticus*, C. freundii a *Citrobacter freundii*, C. koseri a *Citrobacter koseri*, E. aerogenes a *Enterobacter aerogenes*, E. cloacae a *Enterobacter cloacae*, E. coli a *Escherichia coli*, K. oxytoca a *Klebsiella oxytoca*, K. pneumoniae a *Klebsiella pneumoniae*, K. quasipneumoniae a *Klebsiella quasipneumoniae*, K. variicola a *Klebsiella variicola* y K. ascorbata a *Kluyvera ascorbata*. La columna Paci. Indica el código de tres letras utilizado para cada paciente. En la columna PV_características se indica seguido de “SNPs->” la posición de los SNPs rastreables utilizados en el capítulo I están subrayadas (respecto al plásmido pOXA-48 aislado de la cepa K8 usado como referencia). También se indica la sustitución seguida de la base de la referencia. Seguido de “INS->” se indica si se ha detectado alguna inserción. En el caso que se detecte se indica mediante la posición de la inserción y el gen representativo de la inserción. Seguido de “DEL->” se indica si se ha detectado una deleción indicando la posición de la deleción si se diese. Nótese que en la tabla están incluidas las dos versiones de *Klebsiella pneumoniae* del aislado K165 (paciente JWC).

Cepa	Aislado	Paci.	Fecha aislado (día/mes/año) y servicio	PVs	PV_características
K83	K. pneumoniae_ST628	HKH	14/10/14_en_Neumología	E	SNPs-> <u>22.416</u> -C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K84	K. pneumoniae_ST628	HKH	22/10/14_en_Neumología	E	SNPs-> <u>22.416</u> -C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K90	K. pneumoniae_ST11	TGY	23/10/14_en_Neumología	H	SNPs-> <u>50.468</u> -A:C;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K109	K. pneumoniae_ST11	LPW	9/12/14_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K150	K. oxytoca_ST-	ZDY	28/5/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K163	K. pneumoniae_ST307	JWC	8/6/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K164	K. pneumoniae_ST307	JWC	10/6/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K166	K. pneumoniae_ST307	JWC	18/8/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K171	K. pneumoniae_ST405	KYY	17/6/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K187	K. pneumoniae_ST392	ZGX	9/7/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

K188	K. pneumoniae_ST392	ZGX	13/7/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K207	K. pneumoniae_ST15	JRV	18/8/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
KA2	K. ascorbata_ST-	DXH	22/4/14_en_Neumología	8	SNPs->45.042-T:TA;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
KA5	K. ascorbata_ST-	YWH	26/9/14_en_Neumología	8	SNPs->45.042-T:TA;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
O35	K. pneumoniae_ST34	WUU	23/6/14_en_NA	NA	NA
P47	K. pneumoniae_ST15	EIA	11/8/14_en_Gastrología	1	SNPs->22.416-C:T,26.610-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
R9	K. variicola_ST971	YWH	26/9/14_en_NA	4	SNPs->30420-T:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
R10	K. ascorbata_ST-	YWH	26/9/14_en_NA	8	SNPs->45.042-T:TA;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
R50	K. pneumoniae_ST307	QYW	9/10/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
S7	K. quasipneumoniae_ST1191	YUE	20/10/14_en_Neumología	6	SNPs->40.996-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
S8	E. coli_ST23	YUE	20/10/14_en_NA	6	SNPs->40.996-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
S13	E. coli_ST388	QYW	20/10/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
S17	E. coli_ST388	QYW	20/10/14_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
S40	C. freundii_ST-	YUE	27/10/14_en_NA	6	SNPs->40.996-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
C67	E. coli_ST-	RTQ	30/4/14_en_NA	NA	NA
C96	E. coli_ST1196	XIA	13/5/14_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C128	E. coli_ST46	WUU	10/6/14_en_NA	NA	NA
C152	E. coli_ST68	HAX	20/6/14_en_NA	12	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369;30.591-32.394
C153	E. coli_ST68	HAX	23/6/14_en_Gastrología	12	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369;30.591-32.394
C163	E. coli_ST453	ZDY	27/6/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

C184	E. coli_ST68	HAX	17/7/14_en_Gastrología	12	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369;30.591-32.394
C206	E. coli_ST399	EIA	31/7/14_en_Gastrología	1	SNPs->22.416-C:T,26.610-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
C239	E. coli_ST156	IGJ	3/9/14_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C272	E. coli_ST398	YWH	10/10/14_en_Neumología	10	SNPs->6161-A:C;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
C288	E. coli_ST744	HKH	14/10/14_en_Neumología	E	SNPs->22.416-C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
C289	E. coli_ST744	HKH	22/10/14_en_Neumología	K	SNPs->22.416-C:T,65384-GA:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
C310	E. coli_ST23	YUE	31/10/14_en_Neumología	6	SNPs->40.996-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
C527	E. coli_ST453	ZDY	28/5/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C572	E. coli_ST212	JWC	10/8/15_en_NA	NA	NA
C573	E. coli_ST2600	JWC	18/8/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C586	E. coli_ST-	KYY	17/6/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C609	E. coli_ST99	ZGX	9/7/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C610	E. coli_ST99	ZGX	13/7/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C642	E. coli_ST10	JRV	13/8/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C643	E. coli_ST10	JRV	18/8/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
CF12	C. freundii_ST22	YUE	31/10/14_en_Neumología	6	SNPs->40.996-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
CF13	C. freundii_ST22	YUE	17/10/14_en_Neumología	6	SNPs->40.996-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
CF15	C. freundii_ST-	LPW	9/12/14_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K18	K. pneumoniae_ST322	RTQ	24/4/14_en_NA	NA	NA
K24	K. pneumoniae_ST11	WXQ	5/5/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K31	K. pneumoniae_ST11	XIA	13/5/14_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K47	K. pneumoniae_ST11	IGJ	28/8/14_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K51	K. pneumoniae_ST11	IGJ	3/9/14_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

K52	K. pneumoniae_ST11	IGJ	17/9/14_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K65	K. variicola_ST388	QYW	23/10/14_en_NA	16	SNPs->30420-T:G;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K73	K. variicola_ST388	YWH	10/10/14_en_Neumología	16	SNPs->30420-T:G;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K8	K. pneumoniae_ST11	QIT	25/3/14_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K88	K. pneumoniae_ST11	FIB	23/10/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K89	K. pneumoniae_ST11	FIB	27/10/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K93	K. pneumoniae_ST11	VUC	29/10/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K94	K. pneumoniae_ST11	DAQ	30/10/14_en_NA	NA	NA
KA1	K. ascorbata_ST-	EBN	8/4/14_en_Gastrología	7	SNPs->42.116-T:G,45.042-T:TA;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K1	K. pneumoniae_ST11	DYN	14/3/14_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K116	K. pneumoniae_ST11	FTP	28/1/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K127	K. pneumoniae_ST11	EKW	24/2/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K132	K. pneumoniae_ST15	LIE	12/3/15_en_NA	NA	NA
K133	K. pneumoniae_ST15	LIE	20/3/15_en_NA	NA	NA
K147	K. pneumoniae_ST11	IZX	8/4/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K15	K. pneumoniae_ST11	QXH	22/4/14_en_Urología	20	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->5.201-5.913
K151	K. pneumoniae_ST11	WDV	18/8/15_en_Neumología	N	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->9.392-10.160
K152	K. pneumoniae_ST11	WDV	21/8/15_en_Neumología	N	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->9.392-10.160
K153	K. pneumoniae_ST11	WDV	18/9/15_en_Neumología	N	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->9.392-10.160
K160	K. pneumoniae_ST11	AOG	5/6/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K161	K. pneumoniae_ST11	AOG	12/6/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K162	K. pneumoniae_ST11	AOG	11/9/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K167	K. pneumoniae_ST34	VXF	19/6/15_en_NA	NA	NA
K172	K. pneumoniae_ST307	TAW	16/6/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

K173	K. pneumoniae_ST307	TAW	19/6/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K174	K. pneumoniae_ST307	TAW	7/7/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K197	K. pneumoniae_ST11	IUB	21/7/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K198	K. pneumoniae_ST307	MCZ	22/7/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K199	K. pneumoniae_ST307	MCZ	27/7/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K2	K. pneumoniae_ST11	MRT	21/3/14_en_Neumología	19	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->30.467-32.393
K202	K. pneumoniae_ST11	VZO	11/9/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K208	K. pneumoniae_ST1694	WTX	14/8/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K219	K. pneumoniae_ST15	LKS	27/8/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K221	K. pneumoniae_ST151	OUZ	2/9/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K229	K. pneumoniae_ST11	WDV	18/12/15_en_Neumología	B	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->32.523-45.514;9.392-10.160
K235	K. pneumoniae_ST307	IWH	22/9/15_en_Urología	18	SNPs->45.089-T:C;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K236-1	K. pneumoniae_ST11	AOE	14/12/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K237	K. pneumoniae_ST11	QUB	24/9/15_en_Urología	H	SNPs->50.468-A:C;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K238	K. pneumoniae_ST11	QUB	28/9/15_en_Urología	H	SNPs->50.468-A:C;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K243	K. pneumoniae_ST15	DSO	1/10/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K244	K. pneumoniae_ST15	DSO	6/10/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K25	K. pneumoniae_ST11	MPS	5/5/14_en_Neumología	J	SNPs->59.983-A:C;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K259	K. pneumoniae_ST11	PKO	6/11/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K26	K. pneumoniae_ST11	MPS	6/5/14_en_Neumología	J	SNPs->59.983-A:C;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K260	K. pneumoniae_ST11	PKO	23/11/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K263	K. pneumoniae_ST11	VUP	23/10/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K264	K. pneumoniae_ST11	AAQ	26/10/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K265	K. pneumoniae_ST11	AAQ	2/11/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

K266	K. pneumoniae_ST11	AAQ	6/11/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K267	K. pneumoniae_ST11	AAQ	20/11/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K268	K. pneumoniae_ST11	AAQ	27/11/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K269	K. pneumoniae_ST11	XLQ	27/10/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K270	K. pneumoniae_ST11	XLQ	23/11/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C614	E. coli_ST607	ETW	16/7/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K271	K. pneumoniae_ST11	XLQ	28/12/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C165	E. coli_ST10	YJX	3/7/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K273	K. pneumoniae_ST14	FLM	28/10/15_en_Gastrología	L	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369;30.441-40.416
C166	E. coli_ST10	YJX	10/7/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K28	K. pneumoniae_ST11	SQC	6/5/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C18	E. coli_ST355	RUV	17/3/14_en_NA	NA	NA
K280	K. pneumoniae_ST11	VPX	6/11/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K281	K. pneumoniae_ST11	VPX	20/11/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C325	E. coli_ST137	RUI	24/11/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K289	K. pneumoniae_ST15	CWA	3/12/15_en_NA	NA	NA
C164	E. coli_ST453	ROX	26/6/14_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K29	K. pneumoniae_ST11	SQC	8/5/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C646	E. coli_ST10	HKO	18/8/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K293	K. pneumoniae_ST11	AOE	10/12/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C662	E. coli_ST10	WFZ	11/9/15_en_Neumología	3	SNPs->24298-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
C667	E. coli_ST10	OUZ	2/9/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K294	K. pneumoniae_ST11	NQR	3/12/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C704	E. coli_ST2522	MBD	18/9/15_en_Gastrología	D	SNPs->37.979-T:C,63.876-T:G;INS->7.018_CTX-M-15;DEL->No_detectado

K295	K. pneumoniae_ST11	NQR	11/12/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C717	E. coli_ST10	DSO	1/10/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K296	K. pneumoniae_ST307	DWV	9/12/15_en_NA	NA	NA
C718	E. coli_ST10	DSO	6/10/15_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K297	K. pneumoniae_ST307	DWV	15/12/15_en_NA	NA	NA
K298	K. pneumoniae_ST11	MGW	10/12/15_en_Gastrología	C	SNPs->34.260-C:T;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C728	E. coli_ST10	CPJ	7/10/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K301	K. quasipneumoniae_ST-	WXI	4/2/16_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C752	E. coli_ST10	WJK	5/11/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K306	K. pneumoniae_ST307	UKC	2/2/16_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C777	E. coli_ST6083	NQR	11/12/15_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K308	K. pneumoniae_ST11	FLU	13/1/16_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C778	E. coli_ST354	DWV	9/12/15_en_Neumología	1	SNPs->22.416-C:T,26.610-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
C779	E. coli_ST354	DWV	12/12/15_en_Neumología	1	SNPs->22.416-C:T,26.610-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K309	K. pneumoniae_ST15	KPC	18/1/16_en_Neumología	1	SNPs->22.416-C:T,26.610-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
C781	E. coli_ST44	MGW	10/12/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K312	K. pneumoniae_ST11	LCN	18/1/16_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C784	E. coli_ST137	WLP	15/12/15_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K313	K. pneumoniae_ST11	PLA	18/1/16_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C790	E. coli_ST354	TRD	16/12/15_en_Neumología	1	SNPs->22.416-C:T,26.610-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K314	K. pneumoniae_ST307	LBG	3/2/16_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

K315	K. pneumoniae_ST307	EUY	9/2/16_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
C837	E. coli_ST23	MOX	23/2/16_en_Urología	1	SNPs->22.416-C:T,26.610-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K317	K. pneumoniae_ST11	XQO	19/2/16_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
CF6	C. koseri_ST-	WGN	28/7/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K318	K. pneumoniae_ST307	KZE	12/2/16_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E17	E. cloacae_ST598	GKY	17/9/14_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K319	K. pneumoniae_ST11	WMM	17/2/16_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E18	E. cloacae_ST-	MLP	3/9/14_en_NA	NA	NA
E23	E. aerogenes_ST-	IIX	4/11/14_en_NA	NA	NA
E24	E. aerogenes_ST-	PEI	18/11/14_en_NA	NA	NA
K323	K. pneumoniae_ST11	MZD	25/2/16_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E26	E. cloacae_ST272	IXY	11/2/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K324	K. pneumoniae_ST11	MZD	3/3/16_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E31	E. cloacae_ST250	ROC	7/5/15_en_NA	NA	NA
K326	K. pneumoniae_ST11	AHT	17/3/16_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E40	E. cloacae_ST96	MMD	11/8/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K36	K. pneumoniae_ST11	WXQ	9/7/14_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E41	E. aerogenes_ST-	SHM	25/8/15_en_NA	NA	NA
K39	K. pneumoniae_ST11	WTZ	17/7/14_en_Neurocirugía	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K4	K. pneumoniae_ST11	UQQ	21/3/14_en_Neumología	14	SNPs->21.859-A:G;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K57	K. pneumoniae_ST11	INY	4/9/14_en_Neumología	H	SNPs->50.468-A:C;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K58	K. pneumoniae_ST11	DAQ	7/11/14_en_NA	NA	NA
K59	K. pneumoniae_ST11	KNM	5/9/14_en_NA	NA	NA
K60	K. pneumoniae_ST405	QGM	5/9/14_en_Gastrología	9	SNPs->53.269-T:A;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369

L41	E. coli_ST549	WXQ	NA_en_NA	NA	NA
N33	Raoultella_ST69	HAX	27/7/16_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
Q38	E. coli_ST46	WUU	8/9/14_en_NA	NA	NA
R24	K. oxytoca_ST2	LPW	2/10/14_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
R25	K. pneumoniae_ST11	LPW	2/10/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
R60	E. cloacae_ST484	YUE	NA_en_NA	NA	NA
S53	E. coli_ST457	TGY	3/11/14_en_Neumología	H	SNPs->50.468-A:C;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
V65	E. coli_ST46	WUU	10/2/15_en_NA	NA	NA
X6	K. pneumoniae_ST11	HAX	16/3/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
Z29	E. coli_ST453	ZDY	28/5/15_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
Z39	K. oxytoca_ST-	ZDY	28/5/15_en_Gastrología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
Basterisk5	K. pneumoniae_ST392	ZGX	7/7/15_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
Basterisk6	E. coli_ST99	ZGX	7/7/15_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
Casterisk44	E. coli_ST2600	JWC	8/7/15_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
H73	K. pneumoniae_ST11	HAX	18/1/16_en_NA	17	SNPs->44.432-T:G;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
J78	E. coli_ST1722	TGY	22/3/16_en_NA	H	SNPs->50.468-A:C;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
Kasterisk69	E. coli_ST549	WXQ	15/11/13_en_NA	NA	NA
Kasterisk70	K. pneumoniae_ST11	WXQ	15/11/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K17	Raoultella_ST-	DXH	22/4/14_en_Neumología	F	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K76	K. pneumoniae_ST11	YWR	20/11/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
G21	K. pneumoniae_ST11	FCH	17/7/12_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

K78	K. pneumoniae_ST11	EXJ	23/11/13_en_NA	F	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
G55	E. cloacae_ST522	KMG	7/8/12_en_NA	M	SNPs->6.783-G:T,22.416-C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K79	K. variicola_ST-	VPQ	25/11/13_en_NA	2	SNPs->22.416-C:T,60026-A:C;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
G9	K. pneumoniae_ST405	DIU	2/7/12_en_NA	21	SNPs->10.146-C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
H21	E. cloacae_ST522	KMG	24/9/12_en_NA	M	SNPs->6.783-G:T,22.416-C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
H53	K. pneumoniae_ST487	KMG	8/10/12_en_NA	G	SNPs->22.416-C:T,28.222-A:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
I19	K. pneumoniae_ST405	VWJ	25/1/13_en_NA	F	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
J57	K. variicola_ST971	WZF	20/8/13_en_NA	F	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
J61	K. pneumoniae_ST307	NBD	26/8/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
J66	K. pneumoniae_ST307	NBD	2/9/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
L2	K. pneumoniae_ST405	EVU	28/11/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
J72	C. amalonaticus_ST-	FCH	16/9/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
L27	K. pneumoniae_ST11	YVV	12/11/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
L38	E. coli_ST453	WZF	13/12/13_en_NA	5	SNPs->40.369-AG:A;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
L39	K. oxytoca_ST-	WZF	13/12/13_en_NA	F	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K101	K. pneumoniae_ST11	YNC	13/11/14_en_NA	NA	NA
L44	K. pneumoniae_ST11	PZW	23/12/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
L74	K. pneumoniae_ST11	EGE	16/1/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
M60	K. ascorbata_ST-	GFL	25/2/14_en_NA	F	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
M65	E. cloacae_ST171	KWP	24/2/14_en_NA	13	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369;32.530-46.461
M66	E. coli_ST131	BRG	24/2/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

N11	E. coli_ST155	WIX	12/3/14_en_NA	E	SNPs->22.416-C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
N22	K. pneumoniae_ST307	WIX	17/3/14_en_NA	15	SNPs->22.416-C:T;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
enye2 2	K. pneumoniae_ST11	ZHT	25/4/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
N23	K. pneumoniae_ST11	DKO	14/3/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
N24	E. coli_ST3024	DKO	14/3/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
enye2 7	E. coli_ST453	YEX	28/4/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
enye3 4	K. pneumoniae_ST11	TCB	3/5/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
enye3 5	E. coli_ST393	TCB	3/5/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
N36	K. pneumoniae_ST307	YLG	19/3/14_en_NA	E	SNPs->22.416-C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
N45	K. pneumoniae_ST11	BXD	24/3/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
N46	E. coli_ST10	BXD	24/3/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
N6	C. koseri_ST-	AOI	10/3/14_en_NA	F	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
O44	E. coli_ST131	QHY	30/6/14_en_NA	E	SNPs->22.416-C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
O50	C. freundii_ST62	YLG	30/6/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
O65	E. coli_ST131	HOQ	9/7/14_en_NA	11	SNPs->65398-A:G;INS->No_detectado;DEL->9.392-10.160;14.883-16.369
P26	K. oxytoca_ST15	NDY	4/8/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
P27	E. coli_ST1674	NDY	4/8/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
P45	K. oxytoca_ST971	PLV	11/8/14_en_NA	F	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
P76	K. pneumoniae_ST11	HRL	27/8/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
P77	E. coli_ST1011	HRL	27/8/14_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
L45	K. pneumoniae_ST11	RNF	23/12/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

K321	K. pneumoniae_ST392	EJS	19/2/16_en_Neumología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K34	K. pneumoniae_ST11	FCH	16/10/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E57	E. cloacae_ST522	KMG	11/3/12_en_NA	M	SNPs->6.783-G:T,22.416-C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
E63	E. aerogenes_ST11	UHM	22/3/12_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E73	K. pneumoniae_ST11	UHM	2/4/12_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E74	K. pneumoniae_ST11	UHM	28/3/12_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
E76	K. pneumoniae_ST11	UHM	2/4/12_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
F14	K. pneumoniae_ST11	PLO	16/4/12_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K62	K. pneumoniae_ST11	RNF	11/11/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
F48	K. pneumoniae_ST11	GXA	5/6/12_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K63	E. coli_ST1406	BLO	11/11/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
G14	E. cloacae_ST522	KMG	9/7/12_en_NA	M	SNPs->6.783-G:T,22.416-C:T;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
K64	K. variicola_ST971	BLO	8/11/13_en_Neurocirugía	4	SNPs->30420-T:G;INS->No_detectado;DEL->14.883-16.369
F65	E. coli_ST88	BRG	19/6/12_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K74	K. pneumoniae_ST11	SJH	15/11/13_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
F73	K. pneumoniae_ST11	OKN	26/6/12_en_NA	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado
K165-2	K. pneumoniae_ST307	JWC	NA_en_Urología	A	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->10.160-10358
K165-1	K. pneumoniae_ST307	JWC	NA_en_Urología	I	SNPs->No_detectado;INS->No_detectado;DEL->No_detectado

12.2 Tabla Anexo 2. Descripción de SNPs en las PVs caracterizadas en el capítulo II.

En la columna Posición, los SNPs rastreables utilizados en el capítulo I están subrayadas. En la columna Tipo, snp indica SNPs, ins inserciones detectadas por el programa Snippy, de deleciones detectadas por el programa Snippy. En la columna Tipo SNP, *synonymous* se refiere a SNPs sinónimos, *missense* a no-sinónimos, *stop* a que introducen un codón stop y *other* a otros cambios como SNPs intergénicos, cambios de pauta de lectura o pequeños indels. En la columna Cambio se indica la posición del cambio seguido del cambio respecto a la referencia (usando como referencia la posición de la PV-I aislada de la cepa K8, indicando la posición a continuación de una c.). En la columna Producto se indican las proteínas afectadas con su nombre cuando se lo conoce, en caso de ser una proteína hipotética se indica con HP seguido de un número. En la tabla, NA indica datos desconocidos. En la columna Paciente se indica cada paciente mediante un código de tres letras individualizado para cada paciente. Datos obtenidos de DelaFuente *et. al*²⁷¹.

Cepa	PVs	Posición	Tipo	Posición aa	Tipo SNP	Cambio	Producto	Paciente
C206	1	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	EIA
C206	1	<u>26.610</u>	snp	246/246	missense	c.736G>A	XerD	EIA
C778	1	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	DWV
C778	1	<u>26.610</u>	snp	246/246	missense	c.736G>A	XerD	DWV
C779	1	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	DWV
C779	1	<u>26.610</u>	snp	246/246	missense	c.736G>A	XerD	DWV
C790	1	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	TRD
C790	1	<u>26.610</u>	snp	246/246	missense	c.736G>A	XerD	TRD
C837	1	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	MOX
C837	1	<u>26.610</u>	snp	246/246	missense	c.736G>A	XerD	MOX
K309	1	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	KPC
K309	1	<u>26.610</u>	snp	246/246	missense	c.736G>A	XerD	KPC
K79	2	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	VPQ
K79	2	60026	snp	942/1016	stop_gained	c.2825C>A	traU	VPQ
C662	3	24298	snp	NA	other	c.249+3C>T	HP 10	WFZ

K64	4	30420	snp	NA	other	NA	NA	BLO
R9	4	30420	snp	NA	other	NA	NA	YWH
L38	5	40.369	ins	NA	other	NA	NA	WZF
C310	6	<u>40.996</u>	snp	174/178	missense	c.520G>A	HP 29	YUE
CF12	6	<u>40.996</u>	snp	174/178	missense	c.520G>A	HP 29	YUE
CF13	6	<u>40.996</u>	snp	174/178	missense	c.520G>A	HP 29	YUE
S40	6	<u>40.996</u>	snp	174/178	missense	c.520G>A	HP 29	YUE
S7	6	<u>40.996</u>	snp	174/178	missense	c.520G>A	HP 29	YUE
S8	6	<u>40.996</u>	snp	174/178	missense	c.520G>A	HP 29	YUE
KA1	7	42.116	snp	NA	other	NA	NA	EBN
KA1	7	45.042	del	32/259	other	c.95delA	tral	EBN
KA2	8	45.042	del	32/259	other	c.95delA	tral	DXH
KA5	8	45.042	del	32/259	other	c.95delA	tral	YWH
R10	8	45.042	del	32/259	other	c.95delA	tral	YWH
K60	9	53.269	snp	265/383	missense	c.793A>T	traN	QGM
C272	10	6161	snp	211/435	synonymous	c.633G>T	trbA	YWH
P47	10	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	EIA
P47	10	<u>26.610</u>	snp	246/246	missense	c.736G>A	XerD	EIA
O65	11	65398	snp	NA	other	NA	NA	HOQ
K4	14	21.859	snp	40/114	synonymous	c.120G>A	HP 6	UQQ
N22	15	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	WIX
K65	16	30420	snp	NA	other	NA	NA	QYW
K73	16	30420	snp	NA	other	NA	NA	YWH
H73	17	44.432	snp	658/659	synonymous	c.1974G>T	NikB	HAX
K235	18	45.089	snp	47/259	synonymous	c.141C>T	tral	IWH
G9	21	10.146	snp	NA	other	NA	NA	DIU

K298	C	34.260	snp	NA	other	NA	NA	MGW
C704	D	37.979	snp	53/101	synonymous	c.159C>T	HP 25	MBD
C704	D	63.876	snp	612/731	missense	c.1834G>T	traY-like	MBD
C288	E	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	HKH
K83	E	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	HKH
K84	E	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	HKH
N11	E	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	WIX
N36	E	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	YLG
O44	E	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	QHY
H53	G	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	KMG
H53	G	28.222	snp	130/147	synonymous	c.390G>A	parB	KMG
C289	K	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	HKH
C289	K	65384	ins	NA	other	NA	NA	HKH
K26	J	59983	snp	928/1016	missense	c.2782C>A	traU	MPS
J78	H	<u>50.468</u>	snp	1098/1145	missense	c.3292C>A	TraC	TGY
K237	H	<u>50.468</u>	snp	1098/1145	missense	c.3292C>A	TraC	QUB
K238	H	<u>50.468</u>	snp	1098/1145	missense	c.3292C>A	TraC	QUB
K57	H	<u>50.468</u>	snp	1098/1145	missense	c.3292C>A	TraC	INY
K90	H	<u>50.468</u>	snp	1098/1145	missense	c.3292C>A	TraC	TGY
S53	H	<u>50.468</u>	snp	1098/1145	missense	c.3292C>A	TraC	TGY
E57	M	6.783	snp	4/435	missense	c.11A>C	trbA	KMG
E57	M	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	KMG
G14	M	6.783	snp	4/435	missense	c.11A>C	trbA	KMG
G14	M	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	KMG
G55	M	6.783	snp	4/435	missense	c.11A>C	trbA	KMG
G55	M	22.416	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	KMG

H21	M	6.783	snp	4/435	missense	c.11A>C	trbA	KMG
H21	M	<u>22.416</u>	snp	50/194	synonymous	c.150T>C	HP 8	KMG

Tabla Anexo 3 **Mutaciones en las cepas clínicas utilizadas para caracterizar la evolución intra-paciente.**

Tabla modificada de DelaFuente *et. al.*²⁷¹. Las referencias usadas para cada paciente son las siguientes: para el paciente HKH la referencia fue el asilado C288 (PV-E), para el WDV el K229 (PV-B), para el JWC el aislado K165-2 (PV-A). Nótese que se incluye el análisis de las cepas curadas de pOXA-48 (código cepa + curada en la tabla). Además, en el paciente JWC se incluyen las seis colonias secuenciadas procedentes del aislado K165 (ver apartado 8.2.4.5).

Cepa	Paciente	Localización	Posición contig	Mutación	Gen
C289	HKH	cromosoma	520.447	A→T	gltD←
		cromosoma	2.138.270	C→T	lpp←
		cromosoma	3.277.369	C→A	mrdA→
		cromosoma	4.701.234	G→A	phoU→
		pOXA-48	9.451	Δ1 bp	dgoD← / ←pgaptmp_004759
C289 curada	HKH	cromosoma	504.596	(CGCACGTAAGCAACTGC)1→2	sspA→
		pOXA-48	1	Δ63.590 bp	[pgaptmp_004751]–[pgaptmp_004751]
K151	WDV	cromosoma	3.953.815	T→C	phoQ←
		cromosoma	4.925.698	Δ1.200 bp	pgaptmp_004823
		cromosoma	677.087	G→A	csrA← / ←pgaptmp_000620
		cromosoma	1.853.613	Δ777 bp	pgaptmp_001793
		cromosoma	4.848.107	+78 bp	pgaptmp_004737→slyA←
		otros	92.427	C→A	silS→
		otros	118.764	C→T	umuD← / →ltrA
K152	WDV	cromosoma	3.953.815	T→C	phoQ←
		cromosoma	4.925.698	Δ1.200 bp	pgaptmp_004823
		cromosoma	677.087	G→A	csrA← / ←pgaptmp_000620
		cromosoma	1.853.613	Δ777 bp	pgaptmp_001793
		cromosoma	4.848.107	+78 bp	pgaptmp_004737→slyA←
		otros	92.427	C→A	silS→
		otros	118.764	C→T	umuD← / →ltrA

K153		cromosoma	934.941	G→A	mrkA←
		cromosoma	3.565.842	T→G	pmrB←
		cromosoma	3.953.815	T→C	phoQ←
		cromosoma	4.925.698	Δ1.200 bp	pgaptmp_004823
K229 curada		cromosoma	1.164.436	(AGGCGCAG)1→2	dnaG→ / →rpoD
		pOXA-48	1	Δ52.373 bp	[pgaptmp_005509]–[pgaptmp_005509]
K163		cromosoma	1.510.207	Δ777 bp	[pgaptmp_001481]–[pgaptmp_001483]
		cromosoma	1.789.683	Δ777 bp	[pgaptmp_001721]–[pgaptmp_001723]
		cromosoma	2.157.766	T→C	sufC→
		cromosoma	4.101.517	(A)6→7	pgaptmp_004020→
		pOXA-48	10.160	199bp+	IS1 family /OXA-48 family beta-lactamase
K164		cromosoma	1.789.683	Δ777 bp	[pgaptmp_001721]–[pgaptmp_001723]
		cromosoma	2.157.766	T→C	sufC→
		cromosoma	4.101.517	(A)6→7	pgaptmp_004020→
		cromosoma	1.814.753	A→G	pgaptmp_001746← / ←sbcB
		cromosoma	3.367.940	G→A	asnS→
K166		pOXA-48	10.160	199bp+	IS1 family /OXA-48 family beta-lactamase
		cromosoma	1.789.683	Δ777 bp	[pgaptmp_001721]–[pgaptmp_001723]
		cromosoma	2.157.766	T→C	sufC→
		cromosoma	4.101.517	(A)6→7	pgaptmp_004020→
K165 curada		pOXA-48	10.160	199bp+	IS1 family /OXA-48 family beta-lactamase
		otros	200.409	C→T	pgaptmp_005425←
K165-3	JWC	pOXA-48	1	Δ65.300 bp	[pgaptmp_005447]–[pgaptmp_005447]
		cromosoma	1.510.207	Δ777 bp	[pgaptmp_001481]–[pgaptmp_001483]
		cromosoma	1.789.683	Δ777 bp	[pgaptmp_001721]–[pgaptmp_001723]
		cromosoma	2.157.766	T→C	sufC→
		cromosoma	4.101.517	(A)6→7	pgaptmp_004020→
		cromosoma	4.695.516	A→T	pgaptmp_004589→
		pOXA-48	10.160	199bp+	IS1 family /OXA-48 family beta-lactamase

K165-4	cromosoma	1.510.207	$\Delta 777$ bp	[pgaptmp_001481]–[pgaptmp_001483]
	cromosoma	1.789.683	$\Delta 777$ bp	[pgaptmp_001721]–[pgaptmp_001723]
	cromosoma	2.157.766	T→C	sufC→
	cromosoma	4.101.517	(A)6→7	pgaptmp_004020→
	cromosoma	4.695.516	A→T	pgaptmp_004589→
	cromosoma	3.709.484	A→G	pgaptmp_003635→
	pOXA-48	10.160		
K165-5	cromosoma	1.510.207	$\Delta 777$ bp	[pgaptmp_001481]–[pgaptmp_001483]
	cromosoma	1.789.683	$\Delta 777$ bp	[pgaptmp_001721]–[pgaptmp_001723]
	cromosoma	2.157.766	T→C	sufC→
	cromosoma	4.101.517	(A)6→7	pgaptmp_004020→
	cromosoma	4.695.516	A→T	pgaptmp_004589→
	cromosoma	2.652.412	A→C	hpxR←
	cromosoma	5.116.836	C→A	murB← / ←rrf
	pOXA-48	10.160	199bp+	IS1 family /OXA-48 family beta-lactamase
K165-6	cromosoma	1.654.627	G→A	pgaptmp_001611→
	cromosoma	2.727.998	A→T	pgaptmp_002678←
K165-1	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
K165-7	cromosoma	739.599	C→T	pgaptmp_000735← / ←metK

