

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis de la distribución del plásmido pOXA-48 en  
enterobacterias comensales de la microbiota intestinal de  
pacientes hospitalizados**

**Analysis of pOXA-48 plasmid distribution in commensal  
enterobacteria from the gut microbiota of hospitalised  
patients**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Aída Alonso del Valle**

**Director**

**Álvaro San Millán Cruz**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL PLÁSMIDO pOXA-48 EN ENTEROBACTERIAS  
COMENSALES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

ANALYSIS OF pOXA-48 PLASMID DISTRIBUTION IN COMMENSAL  
ENTEROBACTERIA FROM THE GUT MICROBIOTA OF HOSPITALISED PATIENTS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Aída Alonso del Valle

DIRECTOR

Álvaro San Millán Cruz



# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

Programa de Doctorado en Microbiología y Parasitología



## **TESIS DOCTORAL**

**Análisis de la distribución del plásmido pOXA-48 en enterobacterias comensales de la microbiota intestinal de pacientes hospitalizados**

**Analysis of pOXA-48 plasmid distribution in commensal enterobacteria from the gut microbiota of hospitalised patients**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA  
PRESENTADA POR

**Aída Alonso del Valle**

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:

AÍDA ALONSO DEL VALLE ha realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctora, con el título:

“Análisis de la distribución del plásmido pOXA-48 en enterobacterias comensales de la microbiota intestinal 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

Creo que escribir esta página me está costando más trabajo que el resto de la tesis. Hay que ser muy valiente para poner los sentimientos en palabras, lo voy a intentar, allá voy.

En primer lugar, voy a hacer algo que probablemente no está bien visto, pero nunca me he caracterizado por ser políticamente correcta. Quiero darme las gracias a mí misma. A la Aída que soy ahora, porque me cae razonablemente bien y se ha pegado un currazo escribiendo esta tesis. Pero sobre todo a la Aída que fui, porque no se rindió, porque le echó cojones y porque tomó buenas decisiones. Decidí que hacer la Tesis era un sueño, y lo he convertido en realidad.

Pero no lo he hecho sola, también he tenido mucha suerte, suerte de encontrarme con la gente a la que voy a mencionar aquí y a la que a lo mejor no menciono, porque sois muchos y tengo muy mala memoria.

Primero, gracias a mi director, Álvaro San Millán, cuya calidad humana supera incluso a su calidad científica. Me diste la oportunidad que buscaba justo cuando estaba a punto de rendirme y, me guiaste para cumplir mis objetivos, ayudándome a superarlos con creces, siempre te estaré agradecida por ello.

Gracias a todos los integrantes del PBE, los presentes y los pasados, porque todos sois gente increíble. Habéis hecho que este grupo sea un equipazo, y que trabajar sea un placer. Quiero agradecer muy especialmente a Jero, del que he aprendido tanto. Tú me enseñaste, entre otras muchas cosas, que “ante la duda la injusticia”, “que tu ciencia es tan buena como tus controles” y que “más vale una hora en el ordenador que cien en la poyata”. Tu ojillo largo y tu buen corazón me han sacado del hoyo una plétora de veces (¡somos unos malditos pedantes, pero no merecemos fenecer!). A Javi y a Carmen, compañeros de batalla y amigos, hemos aprendido juntos y habéis sido un gran apoyo, gracias por estar ahí. A Cris, que me recordabas que respirar era importante y la hidratación también, has sido compañera, y ahora eres amiga. A Alicia, que además has dibujado la portada de esta tesis, ¡Gracias!, eres la auténtica mujer renacentista, eres buena en todo. A Alfonso, que a pesar de que habremos coincidido como 3h en 3 años, he aprendido mucho de ti y has sido una pieza fundamental en la escritura de este manuscrito. A Richi y Tori, mis bioinformáticos de confianza, nunca me dais buenas noticias y no entiendo mucho de lo que hacéis, pero os quiero igual. Y a Jorge y Coloma, los más recientes integrantes, ya no imagino un PBE sin vosotros.

Quiero darle las gracias a todas las personas con las que he tenido la suerte de cruzarme y compartir un trocito del camino: Sonia, Natalia, Miguel y Ana Elena, de todos he aprendido algo, con todos he disfrutado. Y en especial a Tere, eres una inspiración como científica y como mujer, y te has convertido en un referente para mí. ¡Qué suerte he tenido por haberte conocido!

También quiero agradecer a los que guiaron mis primeros pasos en ciencia. Especialmente a la “Mamá gallina”, tú me pusiste mi primera pipeta en

## AGRADECIMIENTOS

la mano y me enseñaste a usarla. Pero, al final, me enseñaste mucho más que eso... ¡gracias! (Aunque no se si deberías pedirme disculpas porque eres un poco como el que me dio mi primer cigarro...)

Quisiera agradecerle al Dr. Rafael Cantón y a los integrantes del Departamento de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, sus aportaciones y por supuesto, la materia prima proporcionada para este trabajo.

Au laboratoire du Dr Didier Mazel à l'Institut Pasteur de Paris, merci de m'avoir accueilli et de m'avoir tant appris. Et surtout, pour m'avoir donné l'opportunité de vivre cette expérience inoubliable.

Gracias también al Dr. Carles Úbeda, por acogerme en su laboratorio y enseñarme a hacer esas cosas tan chulas con ratones. Y en especial a Anna, que fue mis manos allí donde yo no podía llegar.

Desde luego, gracias a mi familia, siempre, sin vosotros nada en mi vida habría sido posible. Gracias por inculcarme la curiosidad, la cultura del esfuerzo y del trabajo, gracias por apoyarme siempre, decida lo que decida. Siempre habéis creído en mis sueños y no habéis parado de impulsarme y darme el soporte para que los consiga. Me va a faltar vida para honraros.

Y, por último, pero más importante, a Diego. Es muy difícil perseguir sueños y no morir en el intento, pero tú y yo lo estamos bordando. Me has apoyado a un nivel al que muy pocas personas lo habrían hecho. Has sacrificado tu tiempo, has aguantado mis neuras, mi estrés, la separación forzosa, no tener un duro...la cantidad de sacrificios y gestos de apoyo es inconmensurable y, a pesar de todo, sigues ahí, a mi lado, eres mi paracaídas, sin ti soy un jodido desastre. Pero, sobre todo, me has hecho disfrutar cada minuto de la travesía. Una vez me dijiste, que apostar por mí era apostar al caballo ganador, espero haber estado a la altura. Por ti, por mí. Porque te quiero. Esta tesis, es de los dos.

*Al abuelo Jose, ojalá estuvieras aquí*



# ÍNDICE

PORTADA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	9
ÍNDICE.....	13
ABREVIATURAS.....	15
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS .....	17
RESUMEN .....	19
ABSTRACT .....	21
INTRODUCCIÓN .....	23
Los plásmidos .....	25
Características generales.....	25
Transferencia genética horizontal: la conjugación .....	26
Coste de fitness asociado a los plásmidos .....	27
La paradoja de los plásmidos .....	30
Resistencia a antimicrobianos mediada por plásmidos .....	32
Antibióticos $\beta$ -lactámicos y mecanismos de resistencia .....	33
Enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas .....	35
Los plásmidos de tipo pOXA-48.....	37
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
Cepas, plásmido pOXA-48_K8 y condiciones de cultivo utilizadas en esta tesis. ....	47
Construcción de la colección de transconjugantes.....	47
Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos .....	51
Curvas de crecimiento.....	51
Construcción del plásmido pBGC. ....	52
Construcción de la colección de enterobacterias portadoras de pBGC.....	53
Ensayos de competición mediante citometría de flujo.....	56
Extracción de ADN y secuenciación del genoma .....	59
Análisis bioinformáticos .....	59
Análisis de la distribución de los efectos de <i>fitness</i> del plásmido a través de la filogenia bacteriana. ....	62
Modelo de la dinámica poblacional de plásmidos. ....	63
Parametrización del modelo .....	63
Simulaciones estocásticas de comunidades polimicrobianas.....	64
Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en sólido.....	65

Determinación del número de copias del plásmido .....	66
Determinación de frecuencias de conjugación <i>in vitro</i> .....	67
Determinación de frecuencias de conjugación <i>in vivo</i> .....	68
Análisis estadísticos.....	70
RESULTADOS .....	73
Capítulo 1. Determinación de la distribución de los efectos de <i>fitness</i> del plásmido pOXA-48 en un conjunto de enterobacterias ecológicamente compatibles .....	75
Construcción de una colección de enterobacterias transconjugantes portadoras del plásmido pOXA-48_K8.....	79
Determinación de los efectos de fitness asociados a la presencia de pOXA-48_K8.....	79
Distribución de los efectos de fitness asociados a la presencia del plásmido pOXA-48.....	82
Distribución de los efectos de fitness asociados a pOXA-48 a través de la filogenia de los hospedadores bacterianos.....	84
Modelización del impacto de la variabilidad de los efectos de fitness en la estabilidad de los plásmidos.....	86
La complejidad de las comunidades bacterianas favorece la persistencia de los plásmidos.....	88
Capítulo 2. Análisis de las transmisiones vertical y horizontal de pOXA-48 en un conjunto de enterobacterias ecológicamente compatibles con el plásmido .....	93
Diferencias en los niveles de resistencia antibiótica adquirida asociada a la presencia de pOXA-48_K8. ....	97
Análisis <i>in vitro</i> de las dinámicas de transmisión horizontal del plásmido pOXA-48_K8 en aislados clínicos de <i>Klebsiella</i> spp. y <i>E. coli</i> .....	99
Análisis <i>in vivo</i> de las dinámicas de transmisión horizontal del plásmido pOXA-48_K8 en aislados clínicos de <i>Klebsiella</i> spp. y <i>E. coli</i> .....	103
DISCUSIÓN.....	107
Determinación de la distribución de los efectos de <i>fitness</i> del plásmido pOXA-48 en un conjunto de enterobacterias ecológicamente compatibles .....	109
Análisis de las transmisiones vertical y horizontal de pOXA-48 en un conjunto de enterobacterias ecológicamente compatibles.....	110
Reflexiones finales.....	112
CONCLUSIONES .....	115
CONCLUSIONS .....	119
BIBLIOGRAFÍA.....	123
ANEXO .....	139

## ABREVIATURAS

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**AMC** Amoxicilina- ácido clavulánico

**ANOVA** Análisis de Varianzas

**ARN** Ácido ribonucleico

**ARNm** Ácido ribonucleico mensajero

**ARNt** Ácido ribonucleico de transferencia

**AUC** Área bajo la curva

**BLEE**  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

**BMR** Bacterias multirresistentes

**CME** Estudio de la Carga Mundial de Enfermedades, Lesiones y Factores de Riesgo

**CMI** Concentración mínima inhibitoria

**D** Donador

**DAP** Ácido diaminopimélico

**DO** Densidad óptica

**Ec** *Escherichia coli*

**EGM** Elemento genético móvil

**ERT** Ertapenem

**EUCAST** Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos

**ExPEC** *Escherichia coli* patógena extraintestinal

**FAMD** Análisis factorial de datos mixtos

**ICE** Elementos integrativos y conjugativos

**IMI** Imipenem

**Kpn** *Klebsiella spp.*

**LB** *Lysogeny broth*

**LIPA** Índice local de asociación filogenética

**MALDI-TOF** *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Mass Spectrometer*

**MCMC** Métodos de Monte Carlo basados en cadenas de Markov

**MER** Meropenem

**MH** Müller-Hinton

**NCP** Número de copias del plásmido

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**PBP** *Penicillin Binding Protein* (Proteínas de unión a penicilinas)

**PBS** Tampón fosfato salino

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PFGE** Electroforesis en campo pulsado

**R** Receptor

**RAM** Resistencia a antimicrobianos

**R-GNOSIS** *Resistance of Gram-Negative Organisms: Studying Intervention Strategies*

**SNPs** (single nucleotide polymorfism) polimorfismo de un único nucleótido

**SOC** (*Super Optimal broth + Catabolic Repressor*) Medio super óptimo con repression catabólica

**SST4** Sistema de secreción tipo 4

**ST** Secuenciotipo

**TC** Transconjugante

**TGH** Transferencia genética horizontal

**UFC** Unidad formadora de colonia

### LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

**Figura 1.** Coste en *fitness* producido por los plásmidos

**Figura 2.** Tasa de muertes atribuibles y asociadas a la RAM por región CME en 2019

**Figura 3.** Estructura química de los antibióticos betalactámicos.

**Figura 4.** Variantes del transposón *Tn1999* detectadas en pOXA-48.

**Figura 5.** Distribución global de enterobacterias portadoras de OXA-48.

**Figura 6.** Distribución del plásmido pOXA-48 en una colección de aislados de enterobacterias.

**Figura 7.** Modelo experimental.

**Figura 8.** Construcción del plásmido pBGC.

**Figura 9.** Determinación de los diferentes tipos celulares usando citometría de flujo.

**Figura 10.** Distribución de los efectos de *fitness* de pBGC.

**Figura 11.** Correlación entre los valores de *fitness* relativos calculados en competiciones frente a *E. coli* J53/pBGC y frente a clones isogénicos con pBGC.

**Figura 12.** Representación filogenética de las cepas de enterobacterias usadas en este estudio.

**Figura 13.** Efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 en una colección de enterobacterias silvestres ecológicamente compatibles con el plásmido.

**Figura 14.** Correlación entre los valores relativos de los parámetros de las curvas de crecimiento y el *fitness* relativo.

**Figura 15.** Distribución de los efectos de *fitness* del plásmido.

**Figura 16.** Efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 a través del contenido del genoma bacteriano.

**Figura 17.** Análisis del Indicador Local de Asociación Filogenética (LIPA).

**Figura 18.** Modelización de los efectos de *fitness* de pOXA-48.

## LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

**Figura 19.** Persistencia de los plásmidos en comunidades complejas.

**Figura 20.** Niveles de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de una colección de cepas isogénicas con y sin pOXA-48\_K8.

**Figura 21.** Relación entre el NCP pOXA-48 y los niveles de RAM.

**Figura 22.** Diferencias en la transmisión horizontal del plásmido pOXA-48 en una colección de enterobacterias clínicas.

**Figura 23.** Ensayos de conjugación *in vivo* en un modelo de ratón.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas usadas en este estudio.

**Tabla 2.** Perfiles de susceptibilidad antibiótica de las cepas silvestres, con y sin pOXA-48\_K8, determinados por el método de difusión en disco.

**Tabla 3.** Cebadores utilizados en este estudio.

**Tabla 4.** Contenido plasmídico y genes de resistencia de las cepas silvestres del estudio.

## RESUMEN

Los plásmidos son elementos genéticos móviles extra cromosómicos capaces de transferirse entre bacterias por conjugación. Los plásmidos portan genes accesorios que permiten a sus hospedadores adaptarse a un amplio abanico de ambientes, actuando como uno de los principales motores de la evolución bacteriana. A pesar de su abundancia en las comunidades bacterianas y de las potenciales ventajas asociadas a su adquisición, estos elementos genéticos móviles producen alteraciones fisiológicas en sus hospedadores bacterianos que con frecuencia llevan a una reducción en su capacidad competitiva definida como coste de *fitness*. Este coste de *fitness* hace difícil explicar el mantenimiento y amplia distribución de los plásmidos en las poblaciones bacterianas, un enigma conocido como “la paradoja de los plásmidos”. A lo largo de las últimas décadas se han propuesto algunas soluciones que podrían contribuir a resolverla. Sin embargo, la comprensión de la biología de los plásmidos en las poblaciones naturales se ha visto condicionada por las limitaciones asociadas a los sistemas modelo usados habitualmente, que, salvo notables excepciones, han sido realizados con plásmidos y bacterias de diferentes orígenes ecológicos, o con un único plásmido en una única bacteria.

Un ejemplo dramático de la capacidad de los plásmidos de estimular la evolución bacteriana es el papel central que desempeñan en la propagación de la resistencia a antimicrobianos (RAM) en los patógenos clínicos, lo que representa una de las principales amenazas para la Salud Pública a nivel global. Un grupo especialmente preocupante de bacterias resistentes a antimicrobianos son las enterobacterias productoras de carbapenemasas. El orden *Enterobacterales* está formado por bacterias Gramnegativas que comúnmente se encuentran colonizando el tracto gastrointestinal humano, y que pueden causar infecciones como patógenos primarios u oportunistas. Estas infecciones a menudo se tratan con antibióticos del grupo de los  $\beta$ -lactámicos. Las carbapenemasas son enzimas  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar antibióticos del grupo de los carbapenemas. Las carbapenemasas se adquieren fundamentalmente a través de plásmidos conjugativos. Sin embargo, la distribución de este tipo de plásmidos en sus hospedadores naturales no se produce al azar, y algunas de las asociaciones entre plásmidos portadores de RAM y bacterias patógenas resultan particularmente exitosas, dando lugar a clones de alto riesgo capaces de diseminarse incontrolablemente en entornos clínicos. Un ejemplo de este fenómeno es la fuerte asociación descrita entre el plásmido de resistencia a carbapenemas pOXA-48 y ciertos clones de *Klebsiella pneumoniae*. pOXA-48 es un plásmido conjugativo y de amplio rango de hospedadores que codifica  $\beta$ -lactamasa *bla*<sub>OXA-48</sub>. Se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial y frecuentemente asociado a clones de riesgo clínico como *K. pneumoniae* ST11, ST307 o ST405, causantes de importantes brotes nosocomiales.

El objetivo principal de esta tesis doctoral es estudiar las causas de la persistencia y la distribución del plásmido pOXA-48 en las microbiotas naturales. Con este fin, se ha estudiado la distribución de sus efectos de *fitness* y sus dinámicas de transmisión vertical y horizontal en una colección de enterobacterias clínicas ecológicamente compatibles con el plásmido.

Para ello se introdujo por conjugación el plásmido pOXA-48\_K8, la variante más común detectada en el hospital Ramón y Cajal de Madrid, en una colección de 50 enterobacterias (25 *Escherichia coli* y 25 *Klebsiella spp.*) productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y aisladas de pacientes ingresados en dicho hospital. Se midieron los efectos de *fitness* producidos por el plásmido mediante ensayos de competición y los resultados revelaron un escenario muy dinámico en el cual el plásmido produce una amplia distribución de efectos de *fitness* en los diferentes hospedadores bacterianos, que va desde costes hasta beneficios. Los análisis genéticos revelaron una relación significativa entre los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 y la filogenia de cuatro clones de *K. pneumoniae*, en los cuales el plásmido produce un gran coste en *fitness*, todos ellos pertenecientes al ST1427, infrarrepresentado entre los clones portadores de pOXA-48 detectados en el hospital. Por el contrario, en los clones de *K. pneumoniae* ST11, el grupo que se asocia con pOXA-48 con mayor frecuencia en el hospital, pOXA-48\_K8 no produjo costes en *fitness* significativos o produjo incluso beneficios en alguno de ellos.

Para el análisis de las dinámicas de transmisión vertical en presencia de presión antibiótica se midió el nivel de resistencia adquirida asociada a la presencia del plásmido mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria de cuatro antibióticos  $\beta$ -lactámicos en la colección de clones isogénicos con y sin pOXA-48\_K8. Se observó que los aislados del género *Klebsiella spp.* exhibían niveles de resistencia antibiótica adquirida, asociada a la presencia de pOXA-48, significativamente superiores a los de *E. coli*, lo que además correlaciona con un mayor número de copias del plásmido en los hospedadores del género *Klebsiella spp.* Estos resultados sugieren una mayor expansión clonal de los aislados del género *Klebsiella spp.* portadores del plásmido en presencia de presión antibiótica.

Finalmente, se midió la capacidad de recepción del plásmido pOXA-48\_K8 por conjugación en una selección de 20 clones (10 *E. coli* y 10 *Klebsiella spp.*). Como donadores del plásmido se utilizaron tres cepas portadoras de pOXA-48\_K8 de distinta especie y origen. Se midieron las frecuencias de conjugación por receptor en tres ensayos con distintas complejidades de la comunidad de receptores: conjugaciones con un único receptor, conjugaciones con parejas de receptores en iguales proporciones y conjugaciones con todos los clones receptores en pool. Los resultados mostraron una permisividad a la captación del plásmido significativamente mayor en los clones de *Klebsiella spp.* que en los de *E. coli*, con independencia del donador o el tipo de ensayo. Al realizar ensayos de conjugación *in vivo* en un modelo de ratón con una selección de 6 de los 20 receptores, se observaron los mismo patrones de conjugación que en los ensayos *in vitro*, confirmando la significancia biológica de estos resultados, e indicando que la transmisión horizontal del plásmido pOXA-48\_K8 se ve favorecida entre los clones del género *Klebsiella spp.*

Los resultados de este trabajo contribuyen a explicar no solo la permanencia del plásmido pOXA-48 en las poblaciones de enterobacterias del tracto gastrointestinal humano, sino también su distribución en estas comunidades, donde se encuentra habitualmente más asociado a *Klebsiella spp.*

## ABSTRACT

Plasmids are extra-chromosomal mobile genetic elements able to be transferred between bacteria by conjugation. Plasmids carry accessory genes that allow their hosts to adapt to a wide range of environments, acting as one of the main drivers of bacterial evolution. Despite their abundance in bacterial communities and the potential advantages associated with their acquisition, these mobile genetic elements produce physiological alterations in their bacterial hosts that commonly lead to a reduction in their competitive ability, defined as *fitness cost*. This *fitness cost* makes it difficult to explain the persistence and wide distribution of plasmids in bacterial populations, a puzzle known as the "plasmid paradox". Over the last few decades, different solutions have been proposed to solve this paradox. However, understanding plasmid population dynamics in natural populations has been hampered by the limitations associated with the commonly used model systems, that, with notable exceptions, have been performed using plasmids and bacterial strains from different ecological origins or with a single plasmid in a single bacterium.

A dramatic example of the ability of plasmids to stimulate bacterial evolution is the central role they play in the spread of antimicrobial resistance (AMR) in clinical pathogens, which represents a major threat to public health globally. A particularly concerning group of antimicrobial resistant bacteria are the carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. The *Enterobacteriaceae* family consists of Gram-negative bacteria that are commonly found colonizing the human gastrointestinal tract and can cause infections as primary or opportunistic pathogens. These infections are often treated with  $\beta$ -lactam antibiotics and carbapenemases are  $\beta$ -lactamase enzymes that hydrolyze a broad range of  $\beta$ -lactam antibiotics. Carbapenemases are mainly acquired through conjugative plasmids. However, the distribution of such plasmids in their natural hosts is not random, and some of the associations between AMR-bearing plasmids and pathogenic bacteria are particularly successful, giving rise to high-risk clones that disseminate uncontrollably in clinical settings. An example of this is the strong association described between the carbapenem resistance plasmid pOXA-48 and certain clones of *Klebsiella pneumoniae*. pOXA-48 is a broad host range, conjugative enterobacterial plasmid encoding  $\beta$ -lactamase bla<sub>OXA-48</sub>. pOXA-48 is widely distributed worldwide and frequently associated with clinical risk clones such as *K. pneumoniae* ST11, ST307 or ST405, causing major nosocomial outbreaks.

The main objective of this work is to study the causes of the persistence and distribution of the carbapenem resistance plasmid, pOXA-48. To this end, we determined the distribution of pOXA-48 fitness effects and analyzed its vertical and horizontal transmission dynamics in a collection of clinical enterobacteria ecologically compatible with the plasmid.

For this purpose, the pOXA-48\_K8 plasmid, the most common pOXA-48 variant detected in the *Hospital Ramón y Cajal* from Madrid, was introduced by conjugation into a collection of 50 enterobacteria (25 *Escherichia coli* and 25

*Klebsiella spp.*) producing  $\beta$ -lactamase extended spectrum enzymes (BLEE) isolated from patients admitted to the hospital. The fitness effects produced by the plasmid were measured using competition assays and the results revealed a highly dynamic scenario in which the plasmid produces a wide distribution of fitness effects across different bacterial hosts, ranging from costs to benefits. Genetic analyses revealed a significant association between the pOXA-48 fitness effects and the phylogeny of four *K. pneumoniae* clones, in which pOXA-48\_K8 produces a large *fitness* cost, all of them from the ST1427, underrepresented among the pOXA-48-bearing clones detected in the hospital. In contrast, in *K. pneumoniae* ST11 clones, the group most frequently associated with pOXA-48 in the hospital, pOXA-48\_K8 did not produce significant fitness costs or even benefits in some of them.

For the analysis of vertical transmission dynamics in the presence of antibiotic pressure, the level of acquired resistance associated with the presence of the plasmid was measured by determining the minimum inhibitory concentration of four  $\beta$ -lactam antibiotics in the collection of isogenic clones with and without pOXA-48\_K8. We observed that *Klebsiella spp.* isolates exhibited significantly higher levels of acquired antibiotic resistance, associated with the presence of pOXA-48, than *E. coli*, which correlated with a higher plasmid copy number of pOXA-48 in *Klebsiella spp.* hosts. These results suggest an increased clonal expansion of plasmid carrying *Klebsiella spp.* clones in the presence of antibiotic pressure.

Finally, the capacity to receive the pOXA-48\_K8 plasmid by conjugation was measured in a selection of 20 clones (10 *E. coli* and 10 *Klebsiella spp.*). Three strains carrying pOXA-48\_K8 of different species and origins were used as plasmid donors. Conjugation frequencies per recipient were measured in three assays with different complexities of the recipient community: conjugations with a single recipient, conjugations with pairs of recipients in equal proportions and conjugations with all recipient clones in a pool. The results showed significantly higher plasmid conjugation permissiveness in *Klebsiella spp.* clones than in *E. coli* clones, irrespective of donor or assay type. In vivo conjugation assays in a mouse model, with a selection of 6 of the 20 recipients, showed the same conjugation patterns as in the in vitro assays, confirming the biological significance of these results, and indicating that horizontal transmission of the pOXA-48\_K8 plasmid is favored among *Klebsiella spp.* clones.

The results of this work contribute to explain not only the persistence of the pOXA-48 plasmid in enterobacterial populations of the human gut microbiota, but also its distribution across these communities, where it is more commonly associated with *Klebsiella spp.*

# INTRODUCCIÓN



## Los plásmidos

### *Características generales*

Los plásmidos son moléculas de ADN circular, o lineal<sup>1</sup>, extra cromosómicas, presentes en bacterias, arqueas y algunos eucariotas, capaces de replicar de forma autónoma y de transferirse horizontalmente entre sus hospedadores mediante varios procesos<sup>2,3</sup>. Su tamaño y contenido son muy variables, desde plásmidos con una longitud inferior a una kilobase (Kb) que codifican para un único gen<sup>4</sup>, hasta mega-plásmidos de más de una megabase (Mb), que podrían ser considerados como cromosomas secundarios para su hospedador<sup>5</sup>.

El contenido genético de los plásmidos se organiza de forma modular, es decir, los genes con funciones semejantes se distribuyen en las mismas regiones de ADN<sup>6</sup>. Así pues, los módulos en los que se agrupan genes esenciales para la biología del plásmido serán considerados como su chasis genético<sup>7</sup>. Además de los genes esenciales, los plásmidos a menudo codifican genes accesorios que pueden resultar beneficiosos para sus hospedadores, ayudándoles a adaptarse a gran cantidad de ambientes y jugando un papel crucial en la ecología y evolución bacterianas<sup>8,9</sup>.

Entre los módulos de genes esenciales cabe destacar los módulos dedicados a la replicación y al mantenimiento de los plásmidos en sus hospedadores.

*Módulo de replicación del plásmido* (también denominado replicón): en él se agrupan los genes y secuencias implicadas en la replicación autónoma del plásmido, entre los que se distinguen: el origen de replicación, *oriV*, secuencia reconocible por la proteína iniciadora de la replicación, y que es característica de cada replicón<sup>10</sup>; el gen que codifica para la proteína iniciadora de la replicación Rep; y genes implicados en el control de la replicación<sup>10</sup>. Existen tres mecanismos principales de replicación para los plásmidos: replicación  $\theta$ , círculo rodante y desplazamiento de cadena<sup>10</sup>. Los distintos sistemas de control de estos mecanismos conllevan la aparición de fenómenos de incompatibilidad entre plásmidos con mecanismos altamente relacionados, lo que permite la clasificación de los plásmidos según su grupo de incompatibilidad (Inc)<sup>11</sup>. Los distintos orígenes de replicación determinan también el número de copias de un plásmido en una célula<sup>12</sup>, que varía dependiendo del plásmido y del hospedador. Para replicarse, los plásmidos requieren la maquinaria replicativa del hospedador, por lo que las secuencias codificadas en esta región también determinan el tipo de hospedador en el que un determinado plásmido podrá replicar, definiendo así lo que se conoce como su rango de hospedadores, con importantes implicaciones en su ecología<sup>10</sup>.

*Módulo de estabilidad*: en él se agrupan los genes encargados de mantener el plásmido en el linaje celular tras la replicación de su hospedador, es decir, sistemas que tratan de evitar la pérdida del plásmido por segregación. Estos mecanismos de supervivencia están estrechamente relacionados con el número de copias: así los plásmidos con alto número de copias (>10 copias por

célula) tienden a distribuirse libremente y repartirse de forma aleatoria entre las células hijas<sup>13</sup>; y los plásmidos con bajo número de copias (1-5 copias por célula) codifican sistemas activos de partición que reparten las copias del plásmido desde un centrómero hasta ambos polos celulares<sup>14</sup>. Este tipo de plásmidos, a menudo suelen codificar también sistemas toxina-antitoxina, que eliminan aquellas células que hayan perdido el plásmido por segregación, tratando de asegurar la supervivencia del plásmido en la población<sup>15</sup>.

Existe un tercer módulo, presente solo en algunos plásmidos, en el cual se agrupan los genes relacionados con su transmisión horizontal, sobre el cual se entrará en detalle en el siguiente apartado.

Finalmente, los genes accesorios pueden aportar beneficios al hospedador en determinados ambientes, constituyendo una especie de moneda de cambio con éste. Encontramos distintos grupos de genes accesorios según su función: genes que confieren virulencia, permitiendo a sus hospedadores infectar y colonizar nuevos nichos<sup>16</sup>; genes de resistencia a sustancias tóxicas como antibióticos<sup>17,18</sup> o metales pesados<sup>19</sup>; y genes que aportan nuevas funciones metabólicas<sup>20</sup>. Cabe destacar que, en ocasiones, estos genes accesorios se encuentran a su vez embebidos en pequeños elementos genéticos móviles (EGMs), como las secuencias de inserción o los transposones, que están integrados en el plásmido y que les permite moverse en y entre plásmidos, e incluso, integrarse en el cromosoma bacteriano<sup>17,21</sup>.

#### *Transferencia genética horizontal: la conjugación*

Además de transmitirse verticalmente (de madres a hijas a través del linaje celular), los plásmidos son capaces de transmitirse horizontalmente (TGH), de una célula a otra distinta. Esta transmisión horizontal de material genético puede llevarse a cabo mediante cuatro mecanismos fundamentales en procariotas:

- Transformación natural: proceso por el cual algunos organismos adquieren ADN libre presente en el medio<sup>3</sup>.
- Transducción: en la cual una bacteria receptora puede adquirir información genética a través de la infección de virus bacteriófagos o agentes de transferencia similares a bacteriófagos<sup>22-24</sup>
- Conjugación: un proceso por el cual se transfiere material genético y que requiere del contacto entre células a través de un pili o de adhesinas de la superficie celular<sup>3,24,25</sup>.

La conjugación es el proceso más específicamente relacionado con la transferencia horizontal de los plásmidos<sup>3,25</sup>. En la conjugación una célula portadora del plásmido (donador) se une a otra célula libre del plásmido (receptor), mediante la formación de un canal o pili, y le transfiere el ADN plasmídico<sup>26</sup>.

Este proceso implica el reconocimiento de una pequeña secuencia de ADN del plásmido, denominada origen de transferencia (*oriT*) por parte de una

proteína relaxasa (MOB), que realiza un corte específico en el *oriT* y linealiza el plásmido<sup>27</sup>. La relaxasa se queda unida al ADN monocatenario dando lugar a un complejo núcleo-proteico, denominado relaxosoma. El relaxosoma interactúa con una proteína de acoplamiento que lo conecta con un complejo denominado “de apareamiento”. El complejo de apareamiento está compuesto, entre otros elementos por un sistema de secreción tipo 4 (SST4) que transfiere el complejo núcleo-proteico de una célula a otra<sup>28</sup>. Una vez en la célula receptora, la relaxasa cataliza la re-circularización del ADN monocatenario, y la maquinaria de replicación de la célula receptora, reestablece la doble cadena de ADN del plásmido<sup>26</sup>.

Las secuencias génicas que codifican los elementos implicados en la conjugación se localizan en el *módulo de transferencia*. Los plásmidos también pueden clasificarse en función al número de elementos funcionales de la conjugación que codifique:

- Plásmidos conjugativos (pCONJ): que codifican los tres elementos – *oriT*, relaxasa y complejo de transferencia- y que por lo tanto se transfiere por conjugación de forma autónoma<sup>25,29</sup>.
- Plásmidos movilizables (pMOB): codifican sólo la relaxasa y el *oriT* pero requieren la presencia de otro elemento conjugativo en el donador para acoplarse al complejo de apareamiento<sup>25,29</sup>.
- Plásmidos sólo con *oriT* (pOriT): estos plásmidos necesitan la presencia de otros elementos que codifiquen la maquinaria de conjugación, en el donador, para su transferencia<sup>29,30</sup>.
- Plásmidos no mobilizables (pNM): carentes de cualquier elemento funcional que permita su transmisión por conjugación<sup>29</sup>.

#### *Coste de fitness asociado a los plásmidos*

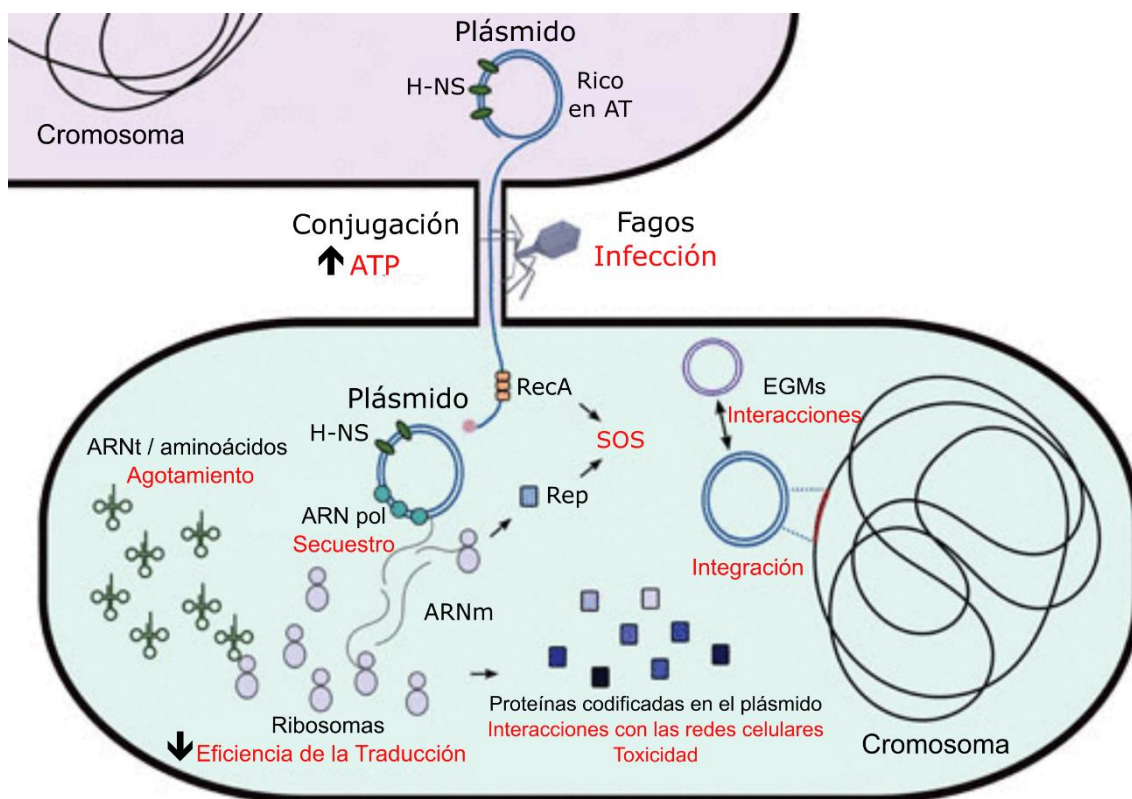
Los plásmidos son capaces de transmitir gran cantidad de información genética en las poblaciones de bacterias, donde son muy abundantes. Los plásmidos moldean la ecología bacteriana ya que permiten a sus hospedadoras adaptarse a una gran variedad de ambientes y son considerados uno de los motores principales de la evolución bacteriana<sup>8,9</sup>. Sin embargo, a pesar de la abundancia de plásmidos en las poblaciones bacterianas y de las posibles ventajas asociadas a su adquisición, estos elementos genéticos producen alteraciones fisiológicas en sus hospedadores bacterianos que pueden conducir a una reducción del *fitness* de la bacteria. Esto quiere decir que, un plásmido que codifique, por ejemplo, un gen de resistencia antibiótica, en presencia de dicho antibiótico (presión selectiva) favorecerá la supervivencia de su hospedador. Sin embargo, en ausencia de presión selectiva, portar un plásmido puede suponer una desventaja frente a otros competidores que no lo lleven, lo que conduciría a la selección negativa del clon portador del plásmido. En esta tesis doctoral se utilizará el término inglés *fitness* para hacer referencia a la capacidad reproductiva y competitiva de una bacteria y la expresión coste de *fitness* como la reducción de esa capacidad<sup>31–33</sup>.

Existen distintos aspectos de la biología de los plásmidos que pueden imponer un coste de *fitness* a sus hospedadores bacterianos<sup>31</sup> (Figura 1):

- *Recepción del plásmido*: cuando un plásmido entra en una bacteria, lo hace como ADN monocatenario<sup>34</sup>, produciendo la activación del sistema SOS. La activación del sistema SOS es una respuesta bacteriana al estrés como consecuencia del aumento de ADN monocatenario en la célula, que conduce a un aumento de las tasas de mutación y recombinación<sup>35,36</sup>. La activación de esta respuesta da lugar también a la inhibición de la división celular, disminuyendo el *fitness* de la bacteria a corto plazo<sup>37</sup>. Por otra parte, la recepción del plásmido también implica un exceso de transcripción transitorio de los genes codificados en el plásmido<sup>38,39</sup>. Como consecuencia del coste que supone la recepción del plásmido en un nuevo hospedador, su transmisión vertical se reduce por la reducción de la división celular. Sin embargo, hasta que los represores transcripcionales del plásmido empiezan a expresarse, otros genes del plásmido, como los relacionados con la conjugación, están sobre expresados, haciendo que el plásmido se disemine rápidamente por conjugación en la población<sup>38</sup>, lo que, a su vez, también impone un coste.
- *Conjugación*: numerosos estudios señalan la conjugación como una de las causas clave del coste de *fitness* asociado a los plásmidos<sup>40,41</sup>. La conjugación permite la rápida diseminación de los plásmidos portadores de genes de interés en una población bacteriana. Sin embargo, se trata de un proceso energéticamente muy costoso para la célula que ralentiza la división celular<sup>42</sup> y reduce la transmisión vertical del plásmido<sup>43</sup>. Además, la conjugación hace vulnerable a la célula a la infección por fagos especializados en la invasión celular a través de los SST4 de la conjugación<sup>44,45</sup>.
- *Replicación*: la replicación del plásmido en el interior celular también puede imponer un coste de *fitness* en el hospedador. Este coste se atribuye a dos factores: las diferencias en la abundancia de adenina-timina (AT) entre el ADN cromosómico y el plasmídico; y el secuestro de la maquinaria replicativa celular por parte del plásmido. En primer lugar, el ADN plasmídico es más rico en AT que el cromosoma bacteriano<sup>46,47</sup>, siendo los transcritos ricos en AT más costosos que los ricos en guanina-citosina (GC) para las bacterias<sup>48</sup>. Aunque el coste de la replicación derivado de este aspecto dependerá en gran medida del contenido en GC del cromosoma bacteriano<sup>49</sup>, es decir, cuanto más GC en el cromosoma, más costosa la replicación del plásmido y viceversa. En segundo lugar, las proteínas Rep del plásmido, reclutan las helicasas y ADN polimerasas bacterianas para la iniciación de la replicación del plásmido. Pero cuando se sobre expresan, las proteínas Rep pueden secuestrar esta maquinaria impidiendo la replicación del cromosoma bacteriano, desencadenando la respuesta

SOS e inhibiendo la división celular. Este efecto es aún más acusado en los plásmidos con alto número de copias<sup>50,51</sup>.

- *Integración*: algunos plásmidos tienen la capacidad de integrarse en el cromosoma bacteriano, como es el caso de los elementos integrativos y conjugativos (ICEs)<sup>52</sup>. Esta integración, a *priori*, podría ser ventajosa para el hospedador, debido a que le permite adquirir los genes de interés del plásmido, prescindiendo de los costes asociados a la replicación independiente del plásmido. Y esto es así en el caso de aquellos ICEs que se dirigen a un único sitio neutral de unión específico en el cromosoma<sup>53</sup>; sin dañar su integridad. Sin embargo, existen algunas familias de ICEs que se integran de forma inespecífica en el cromosoma bacteriano interfiriendo en la expresión de los genes que flanquean el sitio de integración, lo que puede implicar costes en *fitness* en la bacteria receptora<sup>52,54</sup>.
- *Expresión génica*: recientemente se ha demostrado que la traducción no contribuye de forma significativa a los costes de *fitness* de los plásmidos<sup>55</sup>. Si bien es cierto que existe un sesgo en el uso de codones entre el ARNm del plásmido y el cromosómico, este no es un buen predictor de los efectos de *fitness* del plásmido<sup>56</sup>. Por otro lado, en un estudio realizado con seis plásmidos naturales, Rodríguez-Beltrán et al.<sup>55</sup> han observado que los costes de *fitness* de estos plásmidos no correlacionan ni con la disponibilidad de ribosomas ni con su capacidad de procesamiento del ARNm
- *Interacciones entre las proteínas codificadas en los plásmidos y las redes celulares*: la presencia de las proteínas resultantes de la traducción de los genes plasmídicos sí contribuiría de forma significativa con la aparición de costes<sup>50,51,55</sup>. Estas proteínas pueden tener un efecto citotóxico (como los sistemas toxina-antitoxina<sup>57</sup> o las bacteriocinas<sup>58</sup>) o interferir en las rutas metabólicas celulares<sup>50,51,59-61</sup> causando enormes costes en *fitness* en sus hospedadores.
- *Interacciones entre EGMs*: por último, en una misma bacteria pueden coexistir diferentes plásmidos y otros EGMs, afectando al *fitness* del hospedador bacteriano. Las interacciones entre plásmidos son diversas, y en ocasiones tienden a aliviar el coste que éstos pudieran producir por separado, bien mediante relaciones epistáticas entre ellos<sup>62,63</sup>, o bien mediante la inhibición o activación de su movilidad<sup>64,65</sup>.



**Figura 1. Coste en *fitness* producido por los plásmidos.** Representación esquemática de los potenciales efectos sobre la *fitness* que los plásmidos imponen en sus hospedadores. Los distintos aspectos afectados se señalan en negro y en rojo la consecuencia que se desencadena, pudiendo afectar la fisiología celular. Modificado de ref.<sup>31</sup>

### La paradoja de los plásmidos

El coste de *fitness* que los plásmidos imponen en sus hospedadores en ausencia de presión selectiva, sumado a su inevitable pérdida por segregación durante la división celular, hacen que sea difícil explicar cómo se mantienen los plásmidos en las poblaciones bacterianas a largo plazo. Este dilema es comúnmente conocido como “la paradoja de los plásmidos”<sup>9,66,67</sup>. En este escenario, el plásmido se convertiría en un “parásito” y la selección favorecería que la bacteria lo perdiera.

La presencia de una presión selectiva positiva para los fenotipos codificados en el plásmido que resultan beneficiosos para la bacteria puede evitar la pérdida del plásmido. Sin embargo, muchos de estos genes accesorios se localizan en pequeños EGMs embebidos en el plásmido que, pueden escindirse del plásmido e integrarse en el cromosoma, haciendo que el plásmido sea prescindible para la célula, incluso en presencia de selección positiva<sup>68</sup>.

En ausencia de presión selectiva, la transmisión horizontal de los plásmidos por conjugación de unas bacterias a otras podría explicar su persistencia en las poblaciones bacterianas. Es decir, que un plásmido, a pesar de que las condiciones no favorezcan a las bacterias que los portan, sea capaz de actuar como un “parásito” que infecta a un gran número de células<sup>69</sup>. Sin embargo, esta solución tiene algunas limitaciones. En primer lugar, solo justificaría la persistencia de plásmidos conjugativos o movilizables. En segundo

lugar, se han realizado estimaciones teóricas que predicen que las tasas de conjugación de los plásmidos no son lo suficientemente altas como para mantener a los plásmidos en la población solo en base a su capacidad de colonizar nuevos hospedadores<sup>68</sup>. Y, por último, la conjugación, tal y como se detallaba en el apartado anterior, es un proceso muy costoso, por lo que la selección favorecería la pérdida de plásmidos con maquinaria conjugativa según las predicciones teóricas<sup>68-70</sup>.

Los estudios en laboratorio de los últimos años han demostrado que bacterias y plásmidos pueden encontrar distintas soluciones para sobrevenir la paradoja de los plásmidos, tanto evolutivas como ecológicas<sup>67</sup>. Entre las más importantes se cuentan la aparición de mutaciones compensatorias capaces de mitigar el coste del plásmido y la mejora de la conjugación.

- *Mutaciones compensatorias*: uno de los factores más condicionantes de la permanencia de los plásmidos en las poblaciones bacterianas es el coste en *fitness* que producen en sus hospedadores. Numerosos estudios reportan la aparición de mutaciones compensatorias que modifican distintos aspectos de la biología de los plásmidos o las bacterias, capaces de mitigar los costes de *fitness* asociados a la presencia del plásmido<sup>9,67</sup>. Algunas mutaciones pueden aparecer en sólo el plásmido, generando la pérdida o reducción de su capacidad conjugativa<sup>41,71</sup>, o una reducción en la expresión de sus genes accesorios<sup>72</sup>. Otras aparecen solo en el cromosoma bacteriano, afectando a la expresión y regulación génicas<sup>73,74</sup>. E incluso pueden aparecer en ambos, plásmido y cromosoma<sup>60</sup>: las mutaciones del plásmido expanden su rango de hospedadores; y las mutaciones del cromosoma inducen cambios en la expresión génica que mitigan los costes de *fitness* producidos por el plásmido<sup>60</sup>. La aparición de mutaciones compensatorias puede ser extremadamente rápida<sup>75</sup> y puede ocurrir en presencia o ausencia de presión selectiva<sup>73,76</sup>, demostrándose, de hecho, que la selección positiva interactúa con la evolución compensatoria aumentando el tamaño de la población de células portadoras de plásmidos<sup>74</sup>.
- *Mejora de la conjugación*: en contra de las predicciones teóricas, Lopatkin et al.<sup>77</sup> han demostrado como, a pesar de lo aceptado tradicionalmente, en ausencia de presión selectiva, varios plásmidos son capaces de conjugarse a una frecuencia suficiente, en poblaciones bacterianas multi especie, como para persistir en la comunidad. Por otro lado, en el estudio realizado por Hall et al.<sup>78</sup> se demuestra como la presencia de distintas especies de *Pseudomonas spp.* en una misma población favorece la persistencia del plásmido de resistencia a mercurio pQBR57, gracias a la conjugación interespecífica del plásmido, siguiendo una dinámica de transmisión “fuente-sumidero”, En esta dinámica, una especie en la que el plásmido no produce costes de *fitness* (fuente) mantiene el plásmido en la población de otra

especie en la que el plásmido si resulta costoso (sumidero), a través de la conjugación<sup>78</sup>.

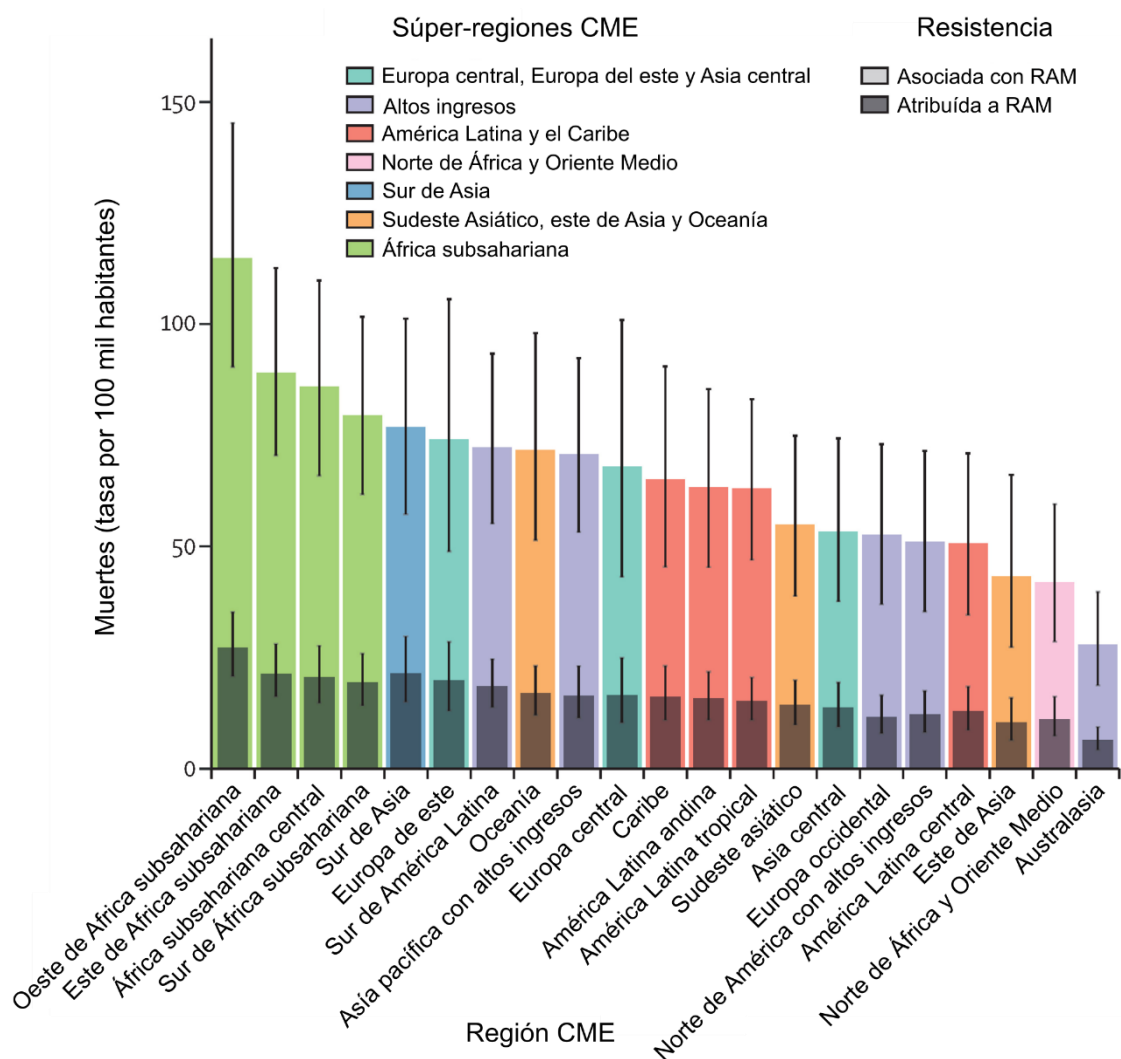
Sin embargo, a pesar de que estas y otras soluciones se han propuesto, nuestra comprensión actual sobre cómo evolucionan los plásmidos y las bacterias en entornos naturales está limitada por dos razones fundamentales: en primer lugar, salvo algunas excepciones<sup>76,78</sup>, la mayoría de los estudios realizados en laboratorio incluyen plásmidos y bacterias de distintos orígenes ecológicos<sup>33,74,79-81</sup>, es decir, plásmidos naturales en bacterias de laboratorio y viceversa. Estos ejemplos pueden no replicar los efectos de *fitness* de los plásmidos en sus hospedadores naturales, que permanecen en gran medida inexplorados. Y, en segundo lugar, la mayoría de estos estudios tienden a medir los efectos de *fitness* de un único plásmido en una única bacteria. Sin embargo, los efectos de *fitness* de un plásmido pueden diferir entre bacterias<sup>78,81-86</sup> y esta variabilidad podría impactar en la persistencia del plásmido en una comunidad bacteriana<sup>87</sup>.

## Resistencia a antimicrobianos mediada por plásmidos

Uno de los principales problemas de Salud Pública a nivel mundial de las últimas décadas es el incremento de mecanismos de resistencia a antimicrobianos (RAM) en bacterias patógenas. La RAM ocurre cuando una bacteria sufre cambios que le permiten resistir el efecto inhibitorio o letal de ciertos antimicrobianos a los que previamente era susceptible, debido generalmente, a la continua exposición a los mismos<sup>88,89</sup>. Como consecuencia del uso inadecuado de antibióticos, se estima que en 2019 se produjeron 4.95 millones de muertes asociadas a la RAM bacteriana en el mundo, de las cuales 1.27 millones de muertes fueron directamente atribuibles a ella<sup>90</sup> (Figura 2).

Los mecanismos de RAM en bacterias pueden adquirirse a través de dos vías: mediante mutaciones en el cromosoma o por la adquisición de EGMs como los plásmidos por THG<sup>91</sup>. Ésta última destaca por ser la más relevante desde el punto de vista clínico y epidemiológico. Los plásmidos juegan un papel clave en la diseminación y la evolución de la RAM, pudiendo codificar y transmitir uno o varios genes de RAM en su genoma accesorio. Suele tratarse de grandes plásmidos (>50 Kb), conjugativos y de amplio rango de hospedadores, que codifican, además complejos sistemas de regulación de su número de copias, así como mecanismos activos de partición y sistemas toxina-antitoxina que limiten su pérdida por segregación<sup>92</sup>.

La asociación entre estos plásmidos y sus hospedadores da lugar a la formación de bacterias multirresistentes (BMR), también conocidas como “superbacterias”<sup>91,93</sup>, capaces de diseminarse de forma incontrolable en entornos nosocomiales. Un ejemplo especialmente preocupante de este fenómeno son las enterobacterias productoras de genes de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, especialmente  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y carbapenemasas<sup>91,92</sup>.



**Figura 2. Tasa de muertes atribuibles y asociadas a la RAM por región CME en 2019.** Se agregaron las estimaciones para cada fármaco, teniendo en cuenta la coocurrencia de la resistencia a múltiples fármacos. Las barras de error muestran los intervalos de incertidumbre del 95%. CME = Estudio de la Carga Mundial de Enfermedades, Lesiones y Factores de Riesgo. Modificada de ref.<sup>90</sup>

### *Antibióticos $\beta$ -lactámicos y mecanismos de resistencia*

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son la familia más numerosa de antimicrobianos. Son agentes bactericidas que, por un lado, inhiben la síntesis de pared celular mediante su unión a las proteínas PBP (penicillin-binding proteins), implicadas en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular<sup>94</sup>; y por otro inducen la lisis bacteriana activando una auto lisina endógena<sup>95</sup>. Las dianas de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se encuentran únicamente en las células bacterianas y no en las células eucariotas, lo que reduce su citotoxicidad, por lo que, junto con otros factores como su bajo coste y su fácil producción, los convierte en el grupo de antibióticos más utilizado en la práctica clínica<sup>96,97</sup>.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se caracterizan por portar un anillo  $\beta$ -lactámico que define químicamente a esta familia y determina su mecanismo de acción. A este anillo se unen, a su vez, otros radicales o anillos, en base a los cuales, se clasifican en 5 grupos funcionales<sup>98</sup>(Figura 3):

- Penicilinas: pueden ser penicilinas naturales (penicilina G), semisintéticas (ampicilina o amoxicilina) y resistentes a penicilinasas (cloxacilina, meticilina y piperacilina)<sup>99</sup>.
- Cefalosporinas: es un grupo más amplio y evolucionado. Se agrupan en cinco generaciones según su capacidad de escapar a los mecanismos de resistencia generados por las bacterias. Son los  $\beta$ -lactámicos de más amplio uso en clínica<sup>99</sup>.
- Carbapenemas: son los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con mayor espectro de actuación. En base a su actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* se distinguen dos grupos: carbapenemas de marcada actividad antipseudomónica, imipenem, meropenem y doripenem; y carbapenemas de limitada actividad antipseudomónica, como el ertapenem. Estos antibióticos son utilizados fundamentalmente para el tratamiento hospitalario de infecciones por bacterias productoras de BLEEs<sup>99</sup>.
- Monobactámicos: poseen un único anillo en su estructura. El único representante de este grupo disponible en clínica actualmente es el aztreonam<sup>99</sup>.
- Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas<sup>99</sup>: se trata de moléculas que se unen de forma irreversible a las enzimas  $\beta$ -lactamasas impidiendo que realicen su función. Realizan su actividad en coordinación con otro  $\beta$ -lactámico, generalmente del grupo de las penicilinas, que se encarga de ejercer la labor bactericida, por lo que se administran en combinación con ellos (amoxicilina- ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam).

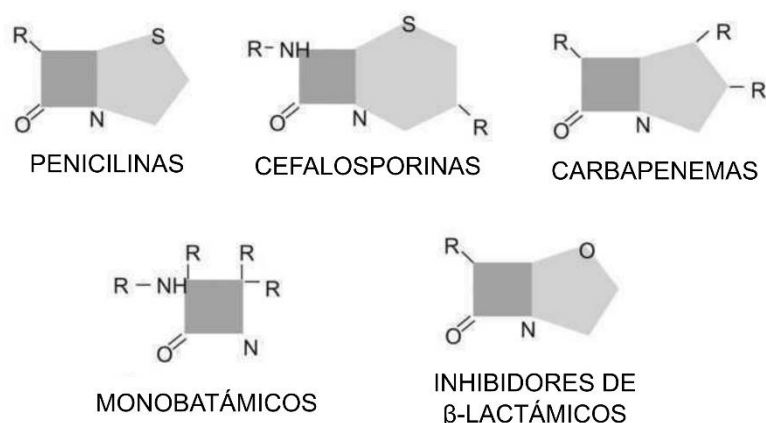


Figura 3. Estructura química de los antibióticos betalactámicos. Modificado de ref.<sup>98</sup>

Debido en parte a su extenso uso desde su descubrimiento, las bacterias han desarrollado multitud de mecanismos de resistencia frente a los  $\beta$ -lactámicos. Se distinguen cuatro tipos de mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos: i) alteraciones de la permeabilidad de la membrana por pérdida o

modificación de porinas<sup>100</sup>; ii) producción de bombas de expulsión activa<sup>101</sup>; iii) modificación de proteínas PBP que dificulten la unión del  $\beta$ -lactámico<sup>102</sup>; iv) y la producción de enzimas,  $\beta$ -lactamasas, capaces de inactivar el antibiótico hidrolizándolo<sup>103</sup>.

La resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos mediada por la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas es especialmente relevante en las bacterias Gramnegativas<sup>104</sup>. Estas enzimas presentan una alta homología con las proteínas PBP, y tienen la capacidad de reconocer al antibiótico e hidrolizarlo. Aunque los genes codificantes de las  $\beta$ -lactamasas (*bla*) pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano, es altamente común encontrarlos en EGMs, principalmente en los plásmidos<sup>92</sup>. Las enzimas  $\beta$ -lactamasa se clasifican atendiendo a su estructura molecular (clasificación de Ambler)<sup>105</sup> o a sus características enzimáticas (clasificación de Bush-Jacoby)<sup>106</sup>. En función de la primera clasificación se distinguen cuatro clases de  $\beta$ -lactamasas: las clases A, C y D son serin- $\beta$ -lactamasas con una serina en su centro activo; y la clase B son metalo- $\beta$ -lactamasas que usan  $Zn^{2+}$  como cofactor y se inhiben por agentes quelantes, pero no por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas<sup>105</sup>.

Son especialmente relevantes desde el punto de vista clínico las BLEEs, mencionadas previamente. Las BLEEs son enzimas que comprenden distintas familias de  $\beta$ -lactamasas de clase A (como TEM, SHV y CTX-M) y D (OXA). Son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, pero son inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas<sup>103,107</sup>. Las BLEE de la familia CTX-M son actualmente las más prevalentes a nivel mundial tanto en ambientes hospitalarios como comunitarios y están habitualmente codificadas en plásmidos de RAM que facilitan su diseminación entre las poblaciones bacterianas<sup>92,108</sup>.

Otro grupo de  $\beta$ -lactamasas de gran interés desde el punto de su prevalencia e importancia clínica son las carbapenemasas. Como se explica anteriormente, los carbapenemas son los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con mayor espectro de actuación por lo que en la práctica clínica son utilizados frente a infecciones nosocomiales producidas por bacterias que ya son resistentes el resto de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como, por ejemplo, las enterobacterias portadoras de BLEEs.

Las carbapenemasas son  $\beta$ -lactamasas de distintos grupos moleculares: i) de clase A, como KPC, capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y aztreonam, pero parcialmente inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas; ii) de clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas, como IMP, VIM y NDM, capaces de hidrolizar todos los tipos de  $\beta$ -lactámicos; iii) y de clase D, tipo OXA, capaces de hidrolizar oxacilina y penicilina, y de las cuales sólo unas pocas poseen actividad carbapenemasa, siendo uno de sus principales representantes la enzima OXA-48<sup>109</sup>.

#### *Enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas*

Las enterobacterias son bacterias Gramnegativas, anaerobias facultativas y no formadoras de esporas que constituyen el orden *Enterobacterales*<sup>110</sup>. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pero su hábitat principal

es el tracto gastrointestinal de los mamíferos, representando menos del 0.1% de la microbiota intestinal<sup>111</sup>. Algunas de estas especies son mutualistas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* o *Citrobacter freundii*, pero ciertas cepas pueden también causar infecciones como patógenas oportunistas, colonizando incluso regiones fuera del tracto gastrointestinal (por ejemplo, sistema urinario o torrente sanguíneo). Sin embargo, otras especies de enterobacterias son patógenos entéricos primarios como *Salmonella entérica*, *Shigella spp.* o *Yersinia spp*<sup>112</sup>.

El incremento de enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas en entornos nosocomiales es un problema de especial relevancia, donde la adquisición de este tipo de patógenos afecta a más del 50 % de los pacientes críticos, llegando a doblar su riesgo de su mortalidad<sup>113</sup>. En los últimos años se ha detectado un incremento de este tipo de resistencias en *E. coli* y *K. pneumoniae*<sup>114</sup>.

Debido a la importancia de *E. coli* y *K. pneumoniae* para este trabajo, se realizará un breve descripción de ambas especies y su relevancia en la adquisición de mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos.

*E. coli* es el coliforme anaerobio más abundante del tracto gastrointestinal humano y comúnmente se encuentra manteniendo una relación simbiótica con las células del epitelio intestinal, causando infecciones únicamente como patógeno oportunista<sup>115</sup>. Sin embargo, la adquisición de ciertos factores de virulencia puede dar lugar a clones patógenos altamente adaptados capaces de causar infecciones intestinales y extraintestinales graves, convirtiéndose en el principal agente causante de infecciones comunitarias y nosocomiales<sup>112,116</sup>. Resulta especialmente relevante el clon de alto riesgo ST131. Se clasifica clínicamente como una *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC), ya que reside predominantemente en el tracto gastrointestinal de mamíferos, pero media su patogenicidad en otros lugares, comúnmente en el tracto urinario, y con frecuencia pueden evolucionar a infecciones del torrente sanguíneo<sup>117</sup>. Está íntimamente asociada a plásmidos de del grupo de incompatibilidad IncF que a menudo portan factores de virulencia y genes de RAM<sup>118,119</sup>. De hecho, se ha demostrado que estas cepas juegan un papel crucial en la diseminación y mantenimiento de la BLEE CTX-M-15, habitualmente codificada en plásmidos de tipo IncFII<sup>120</sup>. La presencia de carbapenemasas de tipo *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>OXA-48</sub> también se ha reportado en este y otros clones de *E. coli* de relevancia clínica<sup>121-123</sup>, detectándose un importante incremento de clones de *E. coli* portadores de resistencia a carbapenemas<sup>114</sup>. En 2019, *E. coli* fue la bacteria responsable de más muertes asociadas y atribuidas a la RAM<sup>90</sup>.

*K. pneumoniae* se encuentra habitualmente colonizando las mucosas de los tractos gastrointestinal y nasofaríngeo. No obstante, también es común encontrarla en nichos ambientales como agua o suelos. Se trata de una bacteria sésil que posee una cápsula polisacáridica que le confiere virulencia y aspecto mucoso<sup>124</sup>. *K. pneumoniae* es patógena oportunista, implicada fundamentalmente en brotes hospitalarios causantes de altas tasas de

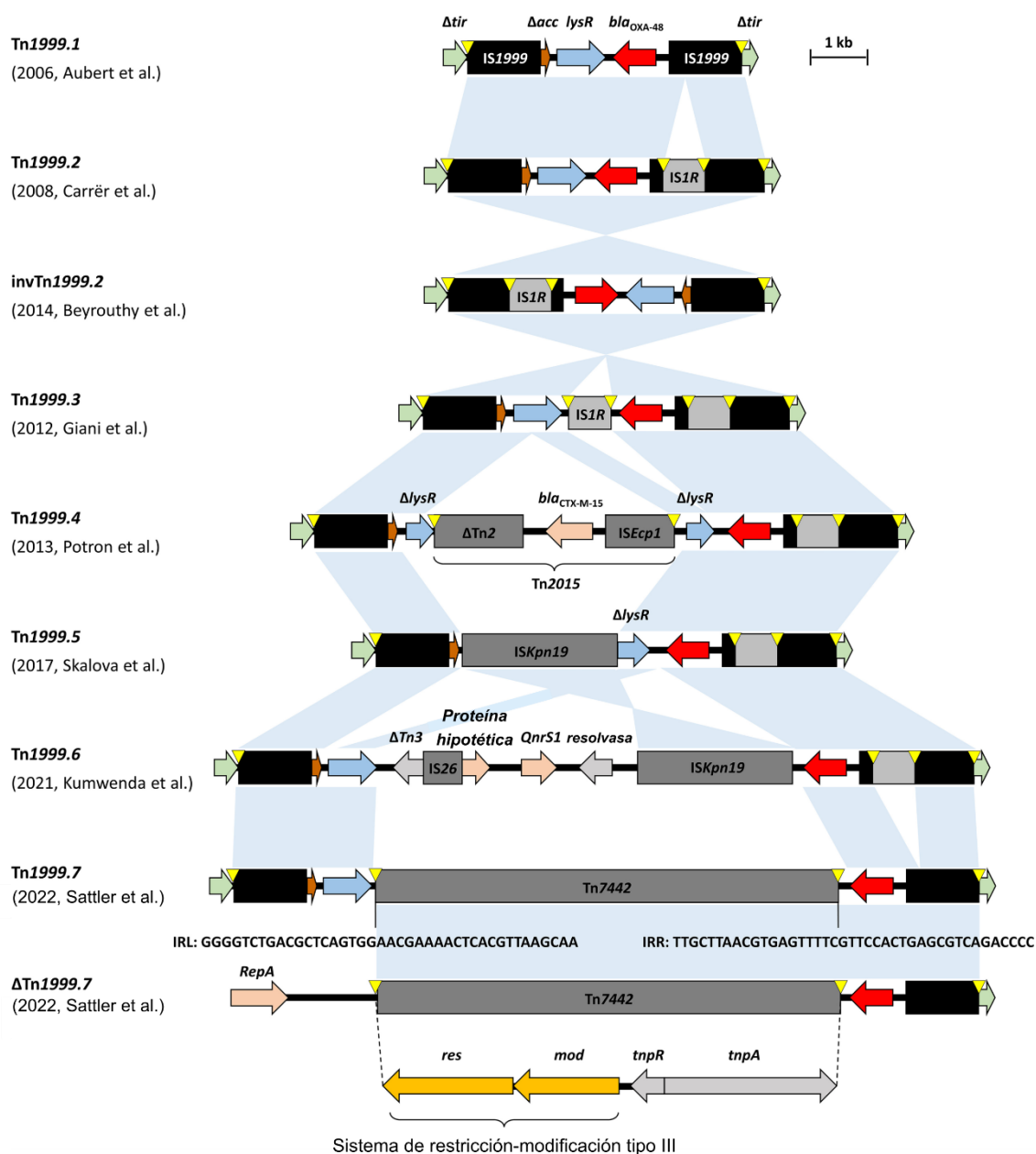
mortalidad<sup>125</sup>. Ciertos clones de especial relevancia clínica se encuentran estrechamente asociados a plásmidos portadores de BLEE y, sobre todo, carbapenemasas, constituyendo las asociaciones entre bacterias y plásmidos de RAM más preocupantes de los entornos nosocomiales<sup>114</sup>. Algunos ejemplos de la asociación entre distintos ST de *K.pneumoniae* y plásmidos de RAM, son: el ST258 y plásmidos de tipo IncF portadores de *bla*<sub>KPC</sub><sup>126</sup>; ST307 y ST147 y distintos plásmidos portadores de *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> y *bla*<sub>VIM</sub><sup>127</sup>; ST11 y ST405 y plásmidos de tipo pOXA-48<sup>128,129</sup>.

## Los plásmidos de tipo pOXA-48

Los plásmidos de tipo pOXA-48 son plásmidos conjugativos, de amplio rango de hospedadores dentro de las enterobacterias y pertenecientes en su mayoría a la familia IncL<sup>130</sup>. Este tipo de plásmido fue aislado por primera vez de un clon *K. pneumoniae* en Turquía en 2001 y codifica la carbapenemasa *bla*<sub>OXA-48</sub>, constituyendo su principal vehículo de transmisión<sup>131,132</sup>.

Estos plásmidos de alrededor de 62 kb tienen un contenido en GC del 51.2 % y guardan una elevada identidad de secuencia con el plásmido pCTX-M3, de tipo IncM2<sup>130</sup>, portador de la  $\beta$ -lactamasa *bla*<sub>CTX-M3</sub>. No obstante, pOXA-48 difiere de éste por la ausencia de la  $\beta$ -lactamasa *bla*<sub>CTX-M3</sub> y por la inserción del transposón Tn 1999, donde se encuentra codificado *bla*<sub>OXA-48</sub><sup>132</sup>. Tn 1999 está compuesto por dos copias idénticas de la secuencia de inserción IS 1999 que lo flanquean y una región central de ADN que codifica la carbapenemasa *bla*<sub>OXA-48</sub> y una proteína reguladora LysR. Se han descrito hasta 7 versiones diferentes de este transposón, detectadas en distintas variantes de pOXA-48<sup>133,134</sup> (Figura 4), siendo especialmente interesante la variante Tn 1999.4 en el interior de la cual, se produce la inserción de un segundo transposón que codifica la BLEE, *bla*<sub>CTX-M-15</sub><sup>133</sup>.

*bla*<sub>OXA-48</sub> es una  $\beta$ -lactamasa de clase D, perteneciente al grupo de carbapenemasas tipo OXA-48, únicas representantes de las  $\beta$ -lactamasas OXA con actividad carbapenemasa<sup>131,135</sup>. Presenta un perfil de hidrólisis de  $\beta$ -lactámicos estrecho, siendo eficaz frente a las penicilinas, algunas cefalosporinas e imipenem, así como frente a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Sin embargo, presentan baja eficacia frente a meropenem<sup>131</sup>. Se teoriza que *bla*<sub>OXA-48</sub> fue movilizada al plásmido desde el cromosoma de *Shewanella spp.* a través del transposón Tn1999 junto con el regulador transcripcional *lysR* adyacente<sup>135</sup>.



**Figura 4. Variantes del transposón *Tn1999* detectadas en pOXA-48.** Las flechas indican las secuencias codificantes y el sentido de la transcripción. El color de las flechas indica el gen que representan: verdes,  $\Delta tir$ ; marrón,  $\Delta acc$ ; azul, *lysR*; rojo, *bla<sub>OXA-48</sub>*; gris, genes relacionados con EGMs; naranja, genes relacionados con sistemas de restricción-modificación; y rojo claro, otros genes. Los cuadros grises y negros representan secuencias de inserción y transposones; los triángulos amarillos, secuencias de inserción duplicadas. IRL/IRR = repeticiones invertidas izquierda y derecha. Modificada de ref.<sup>134</sup>

En la actualidad el plásmido pOXA-48 está distribuido globalmente, y reportan casos en todos los continentes. Aunque se trata de un plásmido endémico en regiones del Norte de África, Oriente Próximo y sur de Europa, se han registrado importantes brotes nosocomiales asociados a enterobacterias portadoras de pOXA-48 en todo el mundo (Figura 5)<sup>135</sup>.

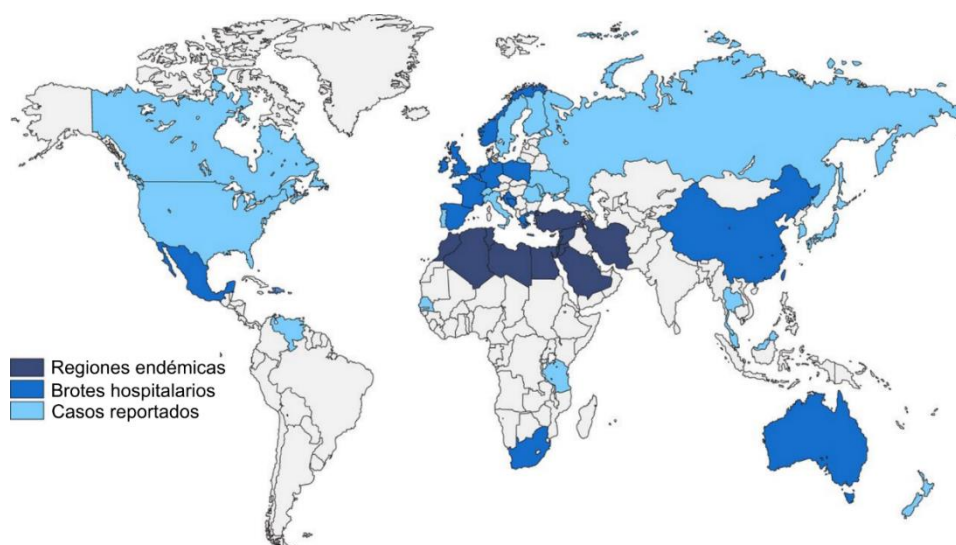


Figura 5. Distribución global de enterobacterias portadoras de OXA-48. Modificado de ref.<sup>135</sup>

La presencia de plásmidos de tipo pOXA-48 se ha descrito en varias enterobacterias (*E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *Klebsiella spp.* o *Salmonella spp.* entre otras), sin embargo, *K. pneumoniae* sigue siendo la bacteria más comúnmente asociada a este tipo de plásmidos (Figura 6)<sup>135–137</sup>. Esta asociación es especialmente exitosa en el caso de ciertos clones de alto riesgo de *K. pneumoniae* como ST11, ST307 y ST405, capaces de producir importantes brotes hospitalarios y de mantener y diseminar el plásmido tanto entre las enterobacterias de la microbiota intestinal de un paciente como entre los distintos pacientes, a menudo co-colonizados con otras enterobacterias portadoras de carbapenemasas<sup>136,138,139</sup>.

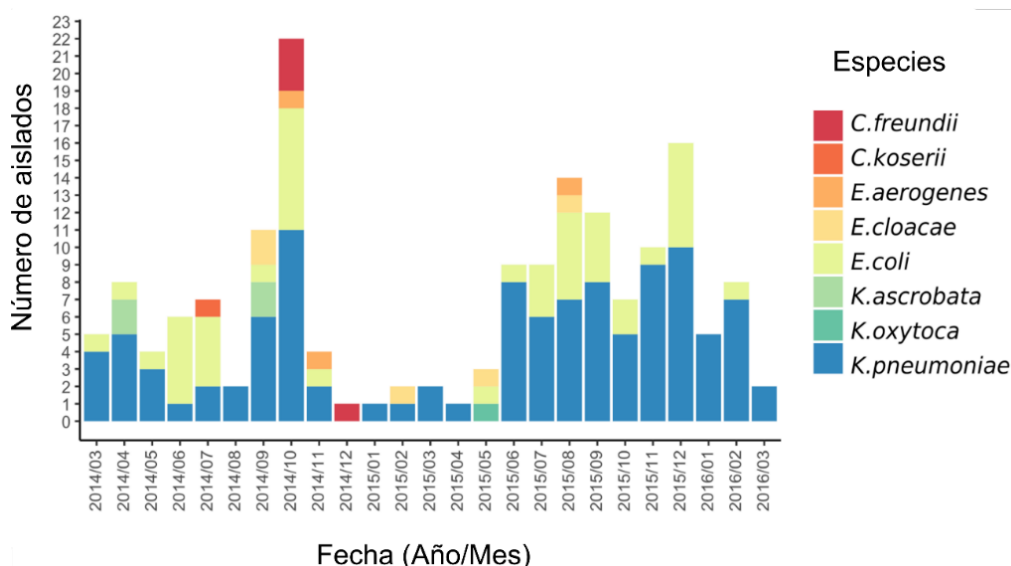


Figura 6. Distribución del plásmido pOXA-48 en una colección de aislados de enterobacterias. Aislamientos de enterobacterias portadoras de pOXA-48 recuperados de pacientes de un hospital terciario de Madrid durante los 25 de estudio. Las especies de los aislados portadores de pOXA-48 están codificadas por colores como se indica en la leyenda. Modificada de ref.<sup>136</sup>



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





- El análisis de las transmisiones vertical y horizontal de pOXA-48 en un conjunto de enterobacterias ecológicamente compatibles con el plásmido.

## MATERIALES Y MÉTODOS



## Cepas, plásmido pOXA-48\_K8 y condiciones de cultivo utilizadas en esta tesis.

Se seleccionaron clones productores de BLEE representativos de la colección R-GNOSIS<sup>137</sup>. La colección de R-GNOSIS fue construida en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (HURYC) de Madrid como parte de un programa de vigilancia activa y detección de pacientes colonizados por enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas, desde marzo de 2014 hasta marzo de 2016 (R-GNOSIS-FP7-HEALTH-F3-2011-282512, <https://cordis.europa.eu/project/id/282512/reporting/es>)<sup>141,142</sup>. El análisis incluyó un total de 28.089 muestras procedentes de 9275 pacientes admitidos en cuatro servicios diferentes (gastroenterología, neurocirugía, neumología y urología) del HURYC. La caracterización de las muestras se realizó durante el periodo de estudio de R-GNOSIS<sup>139,141</sup>; se plaquearon hisopos perianales en los medios selectivos Chromo ID-ESBL y Chrom-CARB/OXA-48 (BioMérieux, Francia) y las colonias bacterianas capaces de crecer en dichos medios se identificaron por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemania). Además, se caracterizaron mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE).

Para este trabajo, se seleccionaron 25 *E. coli* y 25 *Klebsiella spp.* productoras de BLEE aisladas de la colección R-GNOSIS (Tabla 1). Los aislados se seleccionaron basándose en 3 criterios: i) debían ser representativos de la diversidad de dichas especies dentro de la colección (elegidas al azar de acuerdo con los perfiles PFGE más comunes<sup>142</sup>), ii) no debían portar ningún gen codificante de una carbapenemasa; iii) y debían haber sido obtenidas de pacientes localizados en servicios donde habitualmente se hubiera reportado la presencia de enterobacterias portadoras de pOXA-48; y iv) debían haber sido obtenidas de pacientes no colonizados por otros clones portadores de pOXA-48.

Para la realización de esta tesis doctoral, se usó la variante más común de pOXA-48 en la colección R-GNOSIS del HURYC (Figura 7a), de acuerdo con la secuencia genética del plásmido, pOXA-48\_K8, (número de acceso en GenBank MT441554)<sup>81</sup>.

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio Lysogeny Broth (LB) o Müller-Hinton (MH), líquido o suplementado con agar 2 %, según los requerimientos experimentales y se incubaron a 37 °C con agitación constante (250 r.p.m).

## Construcción de la colección de transconjugantes

El plásmido pOXA-48\_K8 se introdujo en la colección de aislados clínicos seleccionados para este trabajo por conjugación. En los ensayos de conjugación, se ponen en contacto una bacteria portadora de un plásmido conjugativo (donador) con una bacteria sin plásmido (receptor) con el objetivo de que el plásmido se transmita del donador al receptor por conjugación. Los clones portadores del plásmido resultantes, denominados transconjugantes, mostrarán las características fenotípicas originales del receptor y las asociadas a la adquisición del plásmido, de acuerdo con las cuales se seleccionan y diferencian del donador y del receptor.

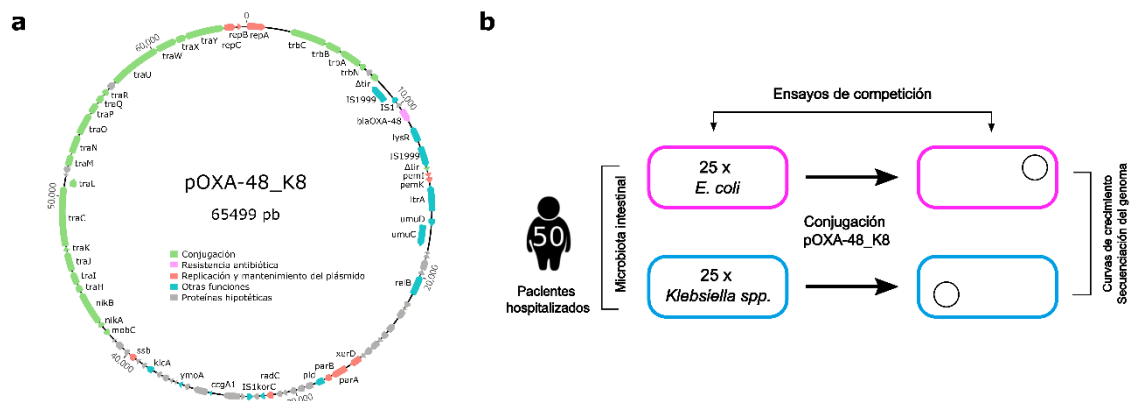
La cepa empleada como donador para la introducción del plásmido pOXA-48\_K8 en la colección de aislados de enterobacterias clínicas fue *E. coli*  $\beta$ 3914<sup>143</sup>. *E. coli*  $\beta$ 3914 es un mutante de *E. coli* K-12 auxótrofo para ácido diaminopimélico (DAP) que permite ser utilizada como donador contra seleccionable, dado que no es capaz de crecer en ausencia de DAP.

En una ronda inicial de conjugación, pOXA-48\_K8 se introdujo en *E. coli*  $\beta$ 3914 desde la cepa silvestre *E. coli* C609<sup>136</sup>. Para ello, la cepa donadora (*E. coli* C609<sup>136</sup>) y la cepa receptora (*E. coli*  $\beta$ 3914<sup>143</sup>) fueron estriadas a partir de glicerol en placas de LB agar con ertapenem 0,5 mg/L (Merck Sharp & Dohme B.V., Países Bajos) y DAP 0,3 mM (Merck KGaA, Alemania), respectivamente, e incubadas durante la noche a 37 °C. Una vez crecidas las estrías, se inocularon, de forma independiente, tubos de cultivo de 15 ml que contenían 2 ml LB con colonias de donador y receptor, y se incubaron durante la noche a 37 °C con agitación constante (250 r.p.m.). Tras la incubación, las células del donador y el receptor fueron precipitadas por centrifugación (15 min, 1500 x *g*) y posteriormente re suspendidas en 300  $\mu$ l de suero salino estéril (NaCl 0,9%). Posteriormente, las soluciones de donador y receptor fueron mezcladas en una proporción 1:1 y esta mezcla fue sembrada como una única gota de 50  $\mu$ l en una placa de LB agar suplementado con DAP 0,3 mM e incubada a 37°C durante 12 h. Los transconjugantes (*E. coli*  $\beta$ 3914 portador de pOXA-48\_K8) se seleccionaron sembrando la biomasa resultante del crecimiento de la mezcla de conjugación en placas de LB suplementadas con DAP 0,3 mM, ertapenem 0,5 mg/L y tetraciclina 15 mg/L (Merck KGaA, Alemania).

La presencia del plásmido pOXA-48\_K8 fue verificada por PCR. Para ello se emplearon cebadores específicos para el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> y para el gen codificante de la proteína de iniciación de la replicación *repC* (Tabla 2), así como la ADN polimerasa PCR BIO HS Taq Mix Red (PCR Biosystems, UK) con las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 1 min a 95 °C; 34 ciclos de desnaturalización de 15 segundos a 95 °C, anillamiento de 15 segundos a 55 °C y extensión de 15 segundos a 72 °C; y 1 ciclo de extensión final de 2 min a 72 °C. Las reacciones de amplificación se prepararon siguiendo las instrucciones facilitadas junto con la polimerasa por la casa comercial (PCR Biosystems, UK). Se utilizaron termocicladores T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

El clon transconjugante de *E. coli*  $\beta$ 3914 portador de pOXA-48\_K8 resultantes de la primera ronda de conjugación, fue utilizado como donador contra seleccionable para introducir el plásmido pOXA-48\_K8 en las 50 enterobacterias silvestres (Figura 7b). Para los ensayos de conjugación se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente, a excepción de la selección de transconjugantes, que se llevó a cabo sembrando la biomasa resultante del crecimiento de la mezcla de conjugación en placas de LB agar sin DAP (para evitar el crecimiento de *E. coli*  $\beta$ 3914/pOXA-48\_K8, incapaz de crecer en ausencia de este aminoácido) y con amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) para seleccionar los transconjugantes. Las concentraciones óptimas de AMC (Normon, España) fueron determinadas experimentalmente para cada aislado

de la colección y oscilan entre los 64 mg/L a 384 mg/L. La presencia de pOXA-48\_K8 en los transconjugantes fue verificada por PCR (tal y como se describe previamente), mediante pruebas de susceptibilidad antibiótica (detalles en el apartado *Pruebas de susceptibilidad antibiótica*) y mediante la secuenciación del genoma completo (detalles en el apartado *Extracción de ADN y secuenciación del genoma*).



**Figura 7. Modelo experimental.** Representación del plásmido pOXA-48\_K8 y diseño experimental. **a** Representación del plásmido pOXA-48\_K8 (número de acceso en GeneBank MT441554). Las regiones codificantes se representan como flechas, indicando el sentido de la transcripción. Los colores indican la clasificación de la función de los genes (ver leyenda). El gen *bla<sub>OXA-48</sub>* se muestra en rosa. **b** Representación esquemática del diseño experimental usado en este estudio.

Con el objetivo de testar la estabilidad del plásmido pOXA-48\_K8 en los transconjugantes, se propagaron cultivos de éstos en LB sin selección antibiótica (dos días consecutivos, diluciones 1:10.000) y posteriormente se plaquearon en placas de LB agar. Tras la incubación a 37 °C durante la noche, 100 colonias independientes de cada transconjugante fueron replicadas tanto en LB agar como en LB agar suplementado con AMC para identificar las colonias portadoras de pOXA-48 (incluyendo controles negativos de los clones silvestres sin el plásmido). Los resultados mostraron que el plásmido era, en general, estable en los transconjugantes; 100% estable en 40 aislados y  $\geq 90\%$  estable en las 10 cepas restantes (Ec01, Ec08, Ec13, Ec18, Ec20, Ec21, Ec22, Kpn02, Kpn05 y Kpn06).

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en este estudio.

Nombre	Especie	ST	Informacion relevante	Referencia
Ec01	<i>E. coli</i>	3863	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec02	<i>E. coli</i>	453	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec03	<i>E. coli</i>	131	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec04	<i>E. coli</i>	131	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec05	<i>E. coli</i>	10	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec06	<i>E. coli</i>	10	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec07	<i>E. coli</i>	90	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec08	<i>E. coli</i>	131	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec09	<i>E. coli</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec10	<i>E. coli</i>	69	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec11	<i>E. coli</i>	648	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec12	<i>E. coli</i>	10	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec13	<i>E. coli</i>	95	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec14	<i>E. coli</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec15	<i>E. coli</i>	131	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec16	<i>E. coli</i>	38	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec17	<i>E. coli</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec18	<i>E. coli</i>	648	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec19	<i>E. coli</i>	648	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec20	<i>E. coli</i>	131	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec21	<i>E. coli</i>	405	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec22	<i>E. coli</i>	131	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec23	<i>E. coli</i>	10	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec24	<i>E. coli</i>	10	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Ec25	<i>E. coli</i>	10	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn01	<i>K. pneumoniae</i>	1427	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn02	<i>K. pneumoniae</i>	307	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn03	<i>K. pneumoniae</i>	1427	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn04	<i>K. pneumoniae</i>	1427	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn05	<i>K. pneumoniae</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn06	<i>K. quasipneumoniae</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn07	<i>K. pneumoniae</i>	11	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn08	<i>K. pneumoniae</i>	1427	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn09	<i>K. pneumoniae</i>	377	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn10	<i>K. pneumoniae</i>	15	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn11	<i>K. quasipneumoniae</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn12	<i>K. quasipneumoniae</i>	1119	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn13	<i>K. pneumoniae</i>	1427	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn14	<i>K. pneumoniae</i>	307	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn15	<i>K. quasipneumoniae</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn16	<i>K. variicola</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn17	<i>K. pneumoniae</i>	307	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn18	<i>K. pneumoniae</i>	15	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn19	<i>K. pneumoniae</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn20	<i>K. pneumoniae</i>	11	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn21	<i>K. pneumoniae</i>	432	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn22	<i>K. pneumoniae</i>	11	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn23	<i>K. pneumoniae</i>	11	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn24	<i>K. pneumoniae</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
Kpn25	<i>K. pneumoniae</i>	-	Cepa silvestre	Proyecto R-GNOSIS
β3914	<i>E. coli</i>		β2163 gyrA462 zei-298::Tn10 (Kmr Emr Tcr)	Le Roux, F. et al., 2007
β3914/pOXA-48	<i>E. coli</i>		β3914 con pOXA-48_K8	Este trabajo
J53	<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> K12 F- met pro Azir	Matsumura, Y. et al., 2018
J53/pBGC	<i>E. coli</i>		J53 con pBGC	Este trabajo
K93	<i>K. pneumoniae</i>	11	Cepa silvestre con pOXA-48_K8	DelaFuente, J. et al 2022
C165	<i>E. coli</i>	10	Cepa silvestre con pOXA-48_K8	DelaFuente, J. et al 2022

ST: Secuenciotipo (basado en el sistema MLST<sup>144</sup>) de siete genes.

## Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos

Los perfiles de susceptibilidad antibiótica se determinaron para cada cepa silvestre y cada transconjugante de la colección por el método de la difusión de disco siguiendo el protocolo descrito por el EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

Se sembraron estrías a partir de glicerol en placas de MH agar (BBL, Becton Dickinson, MD, USA). de cada aislado clínico de la colección, silvestre y transconjugante, y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Una vez crecidas las estrías, se suspendieron colonias de cada aislado, de forma independiente, en 1 ml de NaCl 0,9% hasta obtener una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland, medida utilizando un densitómetro McFarland DEN-1 (BioSan, Letonia). Las diluciones fueron sembradas en placas de MH agar (BBL, Becton Dickinson, MD, USA) con ayuda de un hisopo. Se utilizaron discos los siguientes agentes antimicrobianos: imipenem 10 µg, ertapenem 10 µg, amoxicilina/ácido clavulánico 20/10 µg, rifampicina 30 µg, estreptomycin 300 µg, cloranfenicol 30 µg y amikacina 30 µg (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Las placas se incubaron durante la noche a 37°C. Tras la incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento producidos en torno a los diferentes discos de antibiótico y los resultados se interpretaron siguiendo los puntos de corte establecidos por EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org); Tabla 2).

Alternativamente, también se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ciertos antibióticos β-lactámicos sobre todos los clones de estudio, tanto silvestres como transconjugantes. Este procedimiento se detallará más adelante en el apartado *Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en sólido*.

## Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento para cada aislado de la colección, con y sin pOXA-48\_K8. Cada cepa fue inoculada en LB líquido e incubada a 37 °C con agitación constante (250 r.p.m.) durante la noche. Los cultivos crecidos fueron diluidos 1:1000 en LB fresco en placas de 96 pocillos, que contenían 6 réplicas biológicas de cada cepa portadora del plásmido y 4 réplicas biológicas de su ancestro silvestre sin plásmido. Las placas fueron incubadas durante 22 h a 37 °C en agitación (250 r.p.m.) en un lector de placas (Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek Instruments, Inc, VT, USA) que midió las densidades ópticas (DO) cada 15 min durante la incubación.

A partir de los datos de crecimiento proporcionados por el lector de placas, se usaron los paquetes de R *growthrates* y *flux* para determinar: la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), la densidad óptica máxima ( $OD_{max}$ ) y el área bajo la curva (AUC). Posteriormente se calcularon las  $\mu_{max}$ ,  $OD_{max}$  y AUC relativas siguiendo la siguiente fórmula:

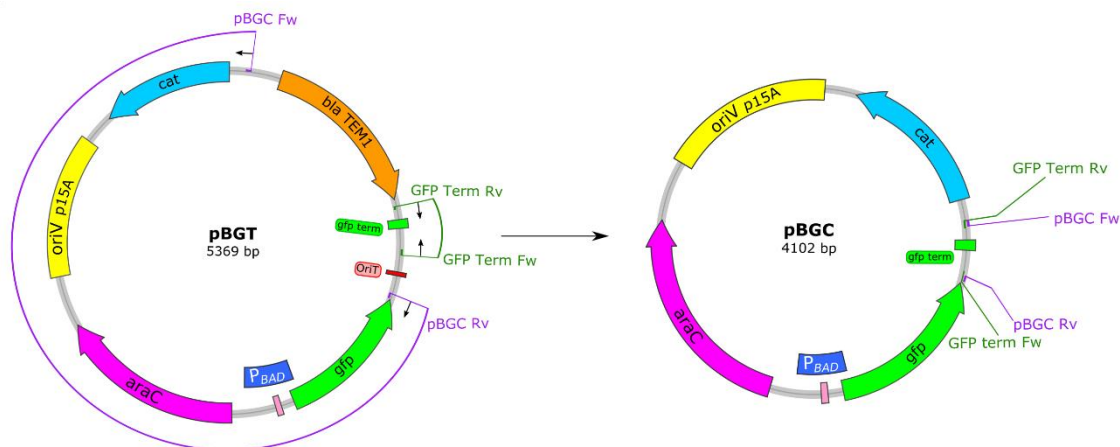
$$OD_{max}, \mu_{max}, AUC \text{ relativas} = \frac{(OD_{max}, \mu_{max}, AUC)_{con \text{ plásmido}}}{(OD_{max}, \mu_{max}, AUC)_{sin \text{ plásmido}}}$$

## Construcción del plásmido pBGC.

Con el objetivo de diferenciar mediante fluorescencia los aislados silvestres durante los posteriores ensayos de competición mediante citometría de flujo, se construyó el plásmido pBGC. pBGC es una versión no movilizable del plásmido pequeño, portador de *gfp*, pBGT<sup>145</sup> (Figura 8, número de acceso en GenBank MT702881).

Por un lado, se amplificó por PCR el plásmido pBGT excluyendo la región codificante del *oriT* y el gen *bla*<sub>TEM1</sub>, utilizando los cebadores pBGC Fw/Rv (Tabla 3, Figura 8). Esta amplificación se realizó usando la ADN polimerasa Phusion Hot Start II a 2 U/μl (ThermoFisher Scientific, MA, USA) bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 30 segundos a 98 °C; 30 ciclos de desnaturalización de 5 segundos a 98 °C, anillamiento de 30 segundos a 57 °C y extensión de 45 segundos a 72 °C; y 1 ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. Por otro lado, se amplificó por PCR la región del terminador de *gfp* usando los cebadores GFP-Term Fw/Rv (Tabla 3, Figura 8), con la misma ADN polimerasa referida anteriormente y bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 30 segundos a 98 °C; 30 ciclos de desnaturalización de 5 segundos a 98 °C, anillamiento de 30 segundos a 55 °C y extensión de 15 segundos a 72 °C; y 1 ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. Ambas reacciones de amplificación se prepararon siguiendo las instrucciones facilitadas junto con la polimerasa por la casa comercial (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Se utilizaron termocicladores T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima DpnI (New England BioLabs, MA, USA) para eliminar los restos de ADN molde antes de ensamblar los amplicones. Finalmente se construyó pBGC mediante el ensamblaje de las regiones amplificadas utilizando el *Gibson Assembly Cloning Kit* (New England BioLabs, MA, USA). La reacción resultante fue transformada por shock térmico en *E. coli* NEB 5-alpha competente (New England BioLabs, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la transformación fue sembrado en placas de LB agar suplementado con arabinosa 0,1% y cloranfenicol 30 mg/L que se incubaron a 37 °C durante la noche. Las colonias portadoras del plásmido fueron seleccionadas mediante fluorescencia. En pBGC, el gen *gfp* está bajo el control de un promotor de tipo  $P_{BAD}$ , por lo que la expresión de GFP está generalmente reprimida y es inducida únicamente en presencia de arabinosa. pBGC fue completamente secuenciado usando los cebadores que se describen en la Tabla 3. Por otro lado, se confirmó que, ni pOXA-48\_K8 ni el plásmido auxiliar pTA-Mob<sup>146</sup> (plásmido portador de la maquinaria de conjugación capaz de movilizar plásmidos que codifican *oriT*), eran capaces de movilizar pBGC por conjugación. Para ello se usó el protocolo de conjugación descrito previamente (apartado *Construcción de la colección de transconjugantes*), confirmando así que pBGC es, en efecto, no movilizable.



**Figura 8. Construcción del plásmido pBGC.** Representación esquemática de la construcción del plásmido pBGC (número de acceso MT702881) a partir del plásmido pBGT. Dos segmentos de pBGT<sup>145</sup> fueron amplificados usando cebadores con una cola de extremos cohesivos (pBGC Fw/Rv y GFP Term Fw/Rv. Tabla 2). El plásmido pBGC resulta de el ensamblaje Gibson de ambos fragmentos. Las regiones codificantes se representan con forma de flecha cuya punta simboliza el sentido de la transcripción. El origen de replicación (*oriV*), el origen de transferencia (*oriT*) y el promotor *P*<sub>BAD</sub> están también indicados.

## Construcción de la colección de enterobacterias portadoras de pBGC

Se obtuvieron células electro competentes de cada aislado silvestre de la colección, no portadores de pOXA-48\_K8, siguiendo una versión modificada del protocolo descrito en Datsenko y Wanner, 2000<sup>147</sup>. Se sembraron estrías de cada cepa a partir de glicerol en placas de LB agar y se incubaron a 37 °C durante la noche. Tras la incubación, se inocularon tubos de cultivo de 15 ml que contenían 2 ml de LB con colonias de cada cepa independientemente, y se cultivaron durante la noche a 37 °C con agitación constante (250 r.p.m.). Los cultivos fueron diluidos 1000 veces en matraces de 500 ml portadores de 100 ml de LB y se incubaron a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar la fase exponencial (DO 0.4-0.6). Una vez alcanzada la fase exponencial, se detuvo el crecimiento introduciendo los cultivos en hielo y se concentraron las células mediante centrifugación (20 min, 5000 r.p.m., 4 °C). Se retiró el sobrenadante, se re suspendieron las células en agua destilada estéril y fría, y se centrifugó la solución con las mismas condiciones descritas previamente. Este paso se repitió en 3 ocasiones. Finalmente, las células fueron re suspendidas en 100 µl de glicerol al 10% y conservadas en hielo hasta su utilización.

El plásmido de fluorescencia pBGC, fue dializado en gota durante 20 min utilizando una membrana de diálisis MF-Millipore 0.025 µm (Merck KGaA, Alemania) y se añadió 5 µl del producto de diálisis a 50 µl de células electrocompetentes frías. El plásmido fue introducido en la colección de aislados clínicos electrocompetentes por electroporación (Gene Pulser Xcell Electroporator, BioRad, CA, USA). Tras la electroporación, las células fueron re suspendidas en 950 µl de medio líquido SOC (*Super Optimal broth + Catabolic repressor*) (ThermoFisher Scientific, MA, USA) e incubadas a 37 °C durante 2 h. Tras la recuperación, los cultivos fueron sembrados, íntegramente, en placas de LB agar suplementado con 50 mg/L de cloranfenicol (NZYTech, Portugal) y L-

arabinosa 0.1 % (NZYTech, Portugal), con el objetivo de seleccionar clones transformantes en base al fenotipo de resistencia a cloranfenicol y emisión de fluorescencia. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche, tras lo cual, se seleccionaron 3 colonias de cada cepa. La presencia del plásmido pBGC fue verificada mediante la observación de fluorescencia y por PCR usando los cebadores pBGC\_seq1\_Fw/Rv (Tabla 3), la ADN polimerasa polimerasa PCR BIO HS Taq Mix Red (PCR Biosystems, UK) y las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 1 min a 95 °C; 34 ciclos de desnaturalización de 15 segundos a 95 °C, anillamiento de 15 segundos a 55 °C y extensión de 15 segundos a 72 °C; y 1 ciclo de extensión final de 2 min a 72 °C. Las reacciones de amplificación se prepararon siguiendo las instrucciones facilitadas junto con la polimerasa por la casa comercial (PCR Biosystems, UK). Se utilizaron termocicladores T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Cabe señalar que no fue posible obtener transformantes para pBGC en 9 de los 50 aislados debido, a un fenotipo preexistente de alta resistencia al cloranfenicol o a la baja eficiencia de transformación de algunos aislados (Ec13, Kpn07, Kpn10, Kpn11, Kpn19, a Kpn23)

**Tabla 2.** Perfiles de susceptibilidad antibiótica de las cepas silvestres, con y sin pOXA-48\_K8, determinados por el método de difusión en disco.

Cepa	Amoxicilina-ácido clavulánico		Ertapenem		Imipenem		Cloranfenicol		Amikacina		Rifampicina		Estreptomicina	
	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*
Ec01	22	S	32	S	30	S	25	S	21	S	15	-	21	-
Ec01/pOXA-48	18	R	30	S	28	S	24	S	22	S	15	-	20	-
Ec02	21	S	28	S	27	S	26	S	18	R	19	-	21	-
Ec02/pOXA-48	8	R	18	R	16	R	26	S	17	R	18	-	20	-
Ec03	20	S	30	S	28	S	27	S	19	S	17	-	21	-
Ec03/pOXA-48	7	R	17	R	18	I	27	S	20	S	20	-	22	-
Ec04	26	S	33	S	29	S	26	S	23	S	19	-	19	-
Ec04/pOXA-48	17	R	30	S	26	S	24	S	22	S	17	-	16	-
Ec05	25	S	33	S	29	S	26	S	18	R	18	-	20	-
Ec05/pOXA-48	9	R	20	R	19	I	27	S	17	R	17	-	21	-
Ec06	22	S	33	S	26	S	29	S	22	S	23	-	24	-
Ec06/pOXA-48	10	R	21	R	21	I	26	S	21	S	17	-	23	-
Ec07	18	S	33	S	30	S	26	S	20	S	17	-	22	-
Ec07/pOXA-48	10	R	21	R	21	I	25	S	21	S	19	-	23	-
Ec08	22	S	32	S	31	S	25	S	24	S	17	-	22	-
Ec08/pOXA-48	20	I	30	S	30	S	25	S	26	S	15	-	24	-
Ec09	22	S	32	S	29	S	25	S	21	S	16	-	23	-
Ec09/pOXA-48	8	R	21	R	22	I	27	S	19	S	14	-	15	-
Ec10	21	S	31	S	28	S	27	S	20	S	18	-	21	-
Ec10/pOXA-48	8	R	20	R	23	S	26	S	18	S	20	-	21	-
Ec11	22	S	35	S	32	S	26	S	20	S	18	-	21	-
Ec11/pOXA-48	9	R	20	R	22	I	26	S	20	S	18	-	24	-
Ec12	14	R	30	S	28	S	26	S	15	R	18	-	19	-
Ec12/pOXA-48	7	R	18	R	18	I	25	S	16	R	16	-	22	-
Ec13	21	S	31	S	29	S	6	R	20	S	19	-	14	-
Ec13/pOXA-48	16	R	31	S	28	S	6	R	20	S	18	-	13	-
Ec14	21	S	30	S	28	S	25	S	22	S	17	-	22	-
Ec14/pOXA-48	7	R	19	R	22	I	25	S	20	S	15	-	16	-
Ec15	22	S	31	S	32	S	20	S	16	R	15	-	23	-
Ec15/pOXA-48	17	R	26	I	28	S	19	S	17	R	15	-	21	-
Ec16	20	S	31	S	28	S	25	S	21	S	17	-	24	-
Ec16/pOXA-48	8	R	17	R	20	I	27	S	22	S	17	-	23	-
Ec17	22	S	32	S	29	S	26	S	19	S	22	-	22	-
Ec17/pOXA-48	8	R	19	R	21	I	26	S	26	S	19	-	25	-
Ec18	21	S	30	S	30	S	6	S	20	S	16	-	23	-
Ec18/pOXA-48	6	R	16	R	22	I	6	S	20	S	19	-	25	-
Ec19	20	S	31	S	27	S	29	S	19	S	18	-	20	-
Ec19/pOXA-48	9	R	22	R	22	I	30	S	20	S	21	-	15	-
Ec20	18	S	28	S	28	S	24	S	18	S	15	-	23	-
Ec20/pOXA-48	9	R	22	R	25	S	26	S	20	S	16	-	24	-
Ec21	17	S	28	S	28	S	6	R	19	S	13	-	16	-
Ec21/pOXA-48	6	R	16	R	22	I	6	R	21	S	18	-	17	-
Ec22	20	S	31	S	28	S	26	S	21	S	15	-	18	-
Ec22/pOXA-48	10	R	21	R	23	S	27	S	20	S	16	-	18	-
Ec23	20	S	30	S	29	S	10	R	20	S	13	-	22	-
Ec23/pOXA-48	8	R	20	R	17	R	10	R	21	S	14	-	23	-
Ec24	18	S	31	S	28	S	24	S	20	S	13	-	17	-
Ec24/pOXA-48	8	R	21	R	20	I	24	S	22	S	17	-	19	-
Ec25	17	R	30	S	31	S	25	S	21	S	15	-	23	-
Ec25/pOXA-48	6	R	16	R	20	I	25	S	20	S	16	-	22	-

Tabla 2. Continuación.

Cepa	Amoxicilina-ácido clavulánico		Ertapenem		Imipenem		Cloranfenicol		Amikacina		Rifampicina		Estreptomicina	
	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*	Diam (mm)	RIS*
Kpn01	17	R	31	S	30	S	27	S	20	S	14	-	19	-
Kpn01/pOXA-48	9	R	20	R	21	I	25	S	20	S	14	-	18	-
Kpn02	23	S	30	S	31	S	11	R	24	S	13	-	22	-
Kpn02/pOXA-48	7	R	20	R	19	I	12	R	19	S	19	-	17	-
Kpn03	16	R	28	S	26	S	25	S	18	S	17	-	18	-
Kpn03/pOXA-48	9	R	20	R	20	I	24	S	18	S	15	-	17	-
Kpn04	18	I	25	R	30	S	15	R	21	S	13	-	18	-
Kpn04/pOXA-48	6	R	15	R	22	I	13	R	25	S	9	-	18	-
Kpn05	21	S	31	S	30	S	9	R	23	S	13	-	21	-
Kpn05/pOXA-48	6	R	20	R	20	I	9	R	25	S	14	-	24	-
Kpn06	16	R	31	S	31	S	31	S	22	S	15	-	20	-
Kpn06/pOXA-48	6	R	18	R	19	I	30	S	23	S	13	-	22	-
Kpn07	18	I	30	S	30	S	6	R	19	S	18	-	15	-
Kpn07/pOXA-48	6	R	19	R	22	I	6	R	19	S	18	-	15	-
Kpn08	20	S	28	S	28	S	26	S	21	S	16	-	21	-
Kpn08/pOXA-48	7	R	20	R	19	I	26	S	21	S	15	-	20	-
Kpn09	21	S	28	S	30	S	30	S	22	S	13	-	18	-
Kpn09/pOXA-48	6	R	20	R	21	I	30	S	22	S	23	-	18	-
Kpn10	13	R	26	I	28	S	25	S	22	S	14	-	25	-
Kpn10/pOXA-48	8	R	19	R	19	I	24	S	21	S	14	-	25	-
Kpn11	20	S	31	S	28	S	27	S	15	R	14	-	23	-
Kpn11/pOXA-48	9	R	21	R	24	S	27	S	19	R	17	-	22	-
Kpn12	21	S	30	S	27	S	25	S	21	S	14	-	24	-
Kpn12/pOXA-48	8	R	19	R	21	I	25	S	21	S	15	-	24	-
Kpn13	22	S	32	S	30	S	27	S	21	S	12	-	23	-
Kpn13/pOXA-48	6	R	20	R	21	I	27	S	19	S	13	-	22	-
Kpn14	17	R	31	S	31	S	29	S	25	S	15	-	20	-
Kpn14/pOXA-48	6	R	20	R	19	I	29	S	22	S	20	-	16	-
Kpn15	18	I	30	S	27	S	26	S	20	S	14	-	18	-
Kpn15/pOXA-48	8	R	20	R	22	I	26	S	21	S	16	-	19	-
Kpn16	17	R	21	R	25	S	27	S	21	S	18	-	24	-
Kpn16/pOXA-48	6	R	16	R	16	R	27	S	20	S	15	-	23	-
Kpn17	20	S	27	S	28	S	27	S	21	S	17	-	25	-
Kpn17/pOXA-48	8	R	21	R	23	S	27	S	22	S	18	-	26	-
Kpn18	18	I	30	S	29	S	18	R	20	S	18	-	18	-
Kpn18/pOXA-48	9	R	16	R	21	I	17	R	21	S	18	-	18	-
Kpn19	18	I	32	S	29	S	28	S	27	S	13	-	21	-
Kpn19/pOXA-48	9	R	23	R	22	I	30	S	25	S	14	-	20	-
Kpn20	16	R	36	S	36	S	6	R	18	S	14	-	23	-
Kpn20/pOXA-48	8	R	21	R	23	S	6	R	21	S	14	-	18	-
Kpn21	19	S	27	S	26	S	6	R	20	S	14	-	24	-
Kpn21/pOXA-48	6	R	20	R	24	S	6	R	22	S	15	-	25	-
Kpn22	16	R	27	S	23	S	6	R	21	S	16	-	18	-
Kpn22/pOXA-48	9	R	19	R	21	I	6	R	19	S	18	-	16	-
Kpn23	15	R	36	S	28	S	6	R	12	R	8	-	15	-
Kn23/pOXA-48	9	R	20	R	23	S	8	R	6	R	15	-	11	-
Kpn24	18	I	31	S	27	S	26	S	22	S	16	-	25	-
Kpn24/pOXA-48	9	R	21	R	23	S	30	S	20	S	14	-	22	-
Kpn25	21	S	28	S	28	S	24	S	13	R	19	-	14	-
Kpn25/pOXA-48	8	R	21	R	26	S	26	S	17	R	16	-	13	-

**Diam (mm)**: diámetro del halo de inhibición en mm; **RIS\***: interpretación del diámetro de inhibición siguiendo las directrices del EUCAST. Categorías de susceptibilidad: R = resistente, S = sensible a régimen de dosis estándar, I = sensible a mayor exposición.

Tabla 3. Cebadores utilizados en este estudio.

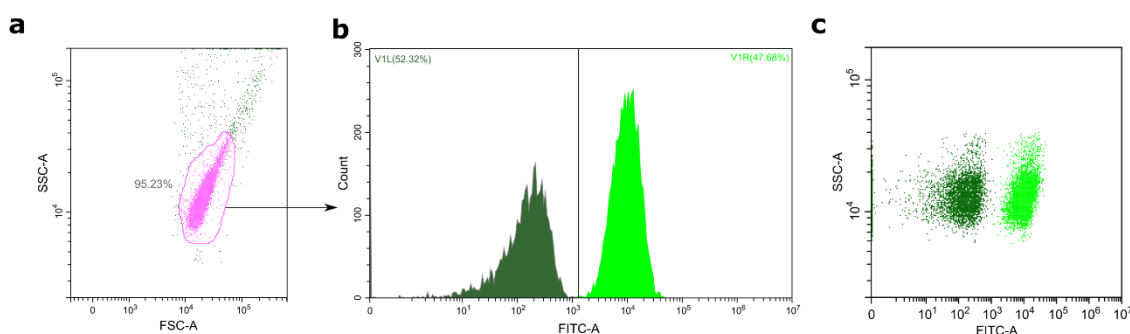
Nombre	Secuencia 3'->5'	Amplicon	Molde	Tm
Oxa-48 Fw	TTGGTGGCATCGATTATCGG	744 pb	pOXA-48	55 °C
Oxa-48 Rv	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC			
Incl Fw	CGGAACCGACATGTGCCTACT	853 pb	pOXA-48	55 °C
Incl Rv	GAACTCCGGCGAAAGACCTTC			
pBGC Fw	CGTTGATCGGCACGTAAG	4042 pb	pBGT	57 °C
pBGC Rv	GCTGTCTAGACTATTTGTATAGTTCATCCATGC			
GFP-Term Fw	atacaaatagtctagacagcGGAATCCTGCTCTGCGAG	60 pb	pBGT	65 °C
GFP-Term Rv	ctcttagctgcccgatcaacgGGTTATTGTCTCATGAGCGG			
pBGC_Seq1_Fw	AGTTAAAAGGTATTGATTTTAA	1080 pb	pBGC	55 °C
pBGC_Seq1_Rv	GCCACATCTTGCGAATA			
pBGC_Seq2_Fw	ATAAGATCACTACCGGGC	1263 pb	pBGC	55 °C
pBGC_Seq2_Rv	ACCCGACAGGACTATAAAGATA			
pBGC_Seq3_Fw	GAGGTAAGTGGCTTGAGG	1211 pb	pBGC	55 °C
pBGC_Seq3_Rv	GTCGCGTCTGTCCATCT			
pBGC_Seq4_Fw	GTTTCCCGACTGGAAGC	1211 pb	pBGC	55 °C
pBGC_Seq4_Rv	CTTTGGTCCCGCTTTGTAC			
pBGC_Seq5_Fw	GTCGGTCGATAAAAAATCGAG	1136 pb	pBGC	55 °C
pBGC_Seq5_Rv	ATGTGGTCTCTTTTCGTTGG			

## Ensayos de competición mediante citometría de flujo

Para la determinación de los efectos de *fitness* del plásmido pOXA.48\_K8 en la colección de aislados clínicos, se realizaron ensayos de competición<sup>148</sup>, usando citometría de flujo. En estos ensayos se cultivan clones portadores de pOXA-48\_K8 junto con sus homólogos isogénicos sin el plásmido, con el objetivo de determinar los cambios en la frecuencia de uno de los competidores con respecto del otro a lo largo del tiempo, lo que permite calcular el *fitness* relativo<sup>148</sup>.

Para ello se usó la colección de cepas silvestres transformadas con pBGC como competidores contra sus respectivos aislados isogénicos con y sin el plásmido pOXA-48\_K8. Específicamente, se realizaron dos tipos de competiciones para cada aislado: i) aislados sin pOXA-48\_K8 frente a sus homólogos portadores de pBGC; y ii) aislados portadores de pOXA-48\_K8 frente a sus homólogos isogénicos sin pOXA-48\_K8 y portadores de pBGC (clones silvestres sin pOXA-48\_K8 transformados con el plásmido de fluorescencia pBGC). Se realizaron 5 réplicas biológicas de cada competición. Se incubaron pre-cultivos durante la noche en LB a 37 °C con agitación (250 r.p.m.) en placas de 96 pocillos. Tras la incubación, los cultivos de cada cepa competidora se mezclaron en proporción 1:1 y la mezcla resultante fue diluida 10.000 veces en 200 µl de LB fresco en una placa de 96 pocillos. La mezcla de competición se incubó durante 24h a 37 °C y en agitación constante a 250 r.p.m. (la baja densidad inicial y la fuerte agitación previenen la conjugación de pOXA-48, testada mediante un control experimental según se describe más adelante).

Para determinar las proporciones iniciales, la mezcla 1:1 inicial fue diluida 2.000 veces en 200 µl de NaCl 0,9% con L-arabinosa 0,1% e incubada a 37 °C con agitación durante 1,5 h para inducir la expresión de GFP (la expresión inducible de GFP permite evitar los costes asociados a la producción de GFP durante la competición de 24h).



**Figura 9. Determinación de los diferentes tipos celulares usando citometría de flujo.** Se usó citometría de flujo para diferenciar entre cepas productoras y no productoras de GFP. (a) se usó el parámetro de dispersión frontal de la luz (FSC) frente al de dispersión ortogonal (SSC) para identificar las células bacterianas en la muestra. (b-c) Las células productoras (verde claro) y no productoras (verde oscuro) de GFP fueron diferenciadas usando el canal FITC-A (isotiocianato de fluoresceína), lo que permitió medir la proporción de cada competidos en la mezcla.

Tras 24h de incubación, se determinaron las proporciones finales siguiendo el mismo protocolo descrito para la determinación de las densidades iniciales. La medida de las proporciones inicial y final fue llevada a cabo mediante

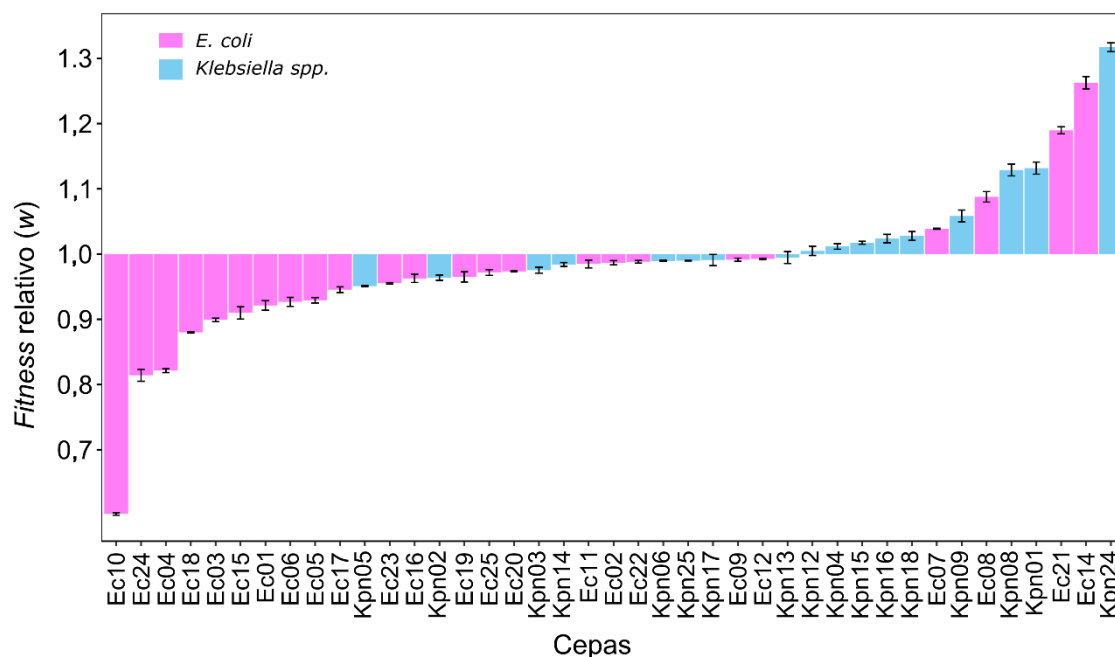
citometría de flujo usando la plataforma CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences, IN, USA) con los siguientes parámetros: caudal de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ , tamaño de núcleo de 22  $\mu\text{m}$  y 10.000 eventos registrados por muestra (Figura 9). El *fitness* de cada cepa relativo a su cepa parental portadora de pBGC fue determinada usando la siguiente fórmula:

$$w = \frac{\ln(N_f/N_i)}{\ln(N_{f,pBGC+}/N_{i,pBGC+})}$$

donde  $w$  es el *fitness* relativo de las cepas con o sin pOXA-48 comparadas con su clon parental portador de pBGC,  $N_i$  y  $N_f$  son el número de células de la cepa libre de pBGC al principio y al final de la competición, y  $N_{i,pBGC+}$  y  $N_{f,pBGC+}$  son el número de células del clon portador de pBGC al principio y al final del ensayo de competición, respectivamente. A partir del *fitness* relativo de los aislados con y sin pOXA-48\_K8 con respecto a su homólogo isogénico portador de pBGC, se obtiene el *fitness* de los aislados portadores de pOXA-48\_K8 en relación con sus versiones parentales sin pOXA-48\_K8, utilizando la siguiente fórmula:  $w_{pOXA-48+}/w_{pOXA-48-}$ . Este procedimiento permite corregir por los efectos de pBGC sobre el *fitness* de las distintas cepas (los efectos de *fitness* de pBGC se muestran en la Figura 10). En concreto, el resultado de la media de las 5 réplicas biológicas independientes de la competición de las cepas portadoras de pOXA-48 frente a las portadoras de pBGC ( $w_{pOXA-48+}$ ) se dividió entre el resultado de la media de las 5 réplicas biológicas independientes de la competición de los aislados libres de pOXA-48 frente a las portadoras de pBGC ( $w_{pOXA-48-}$ ), y se utilizó el método de la propagación de error para calcular el error estándar del valor resultante.

Hay que tener en cuenta que los efectos de *fitness* de pBGC no correlacionan con los observados para pOXA-48 (correlación de Pearson,  $R=0,11$ ,  $t=0,66$ ,  $df=39$ ,  $P=0,51$ ).

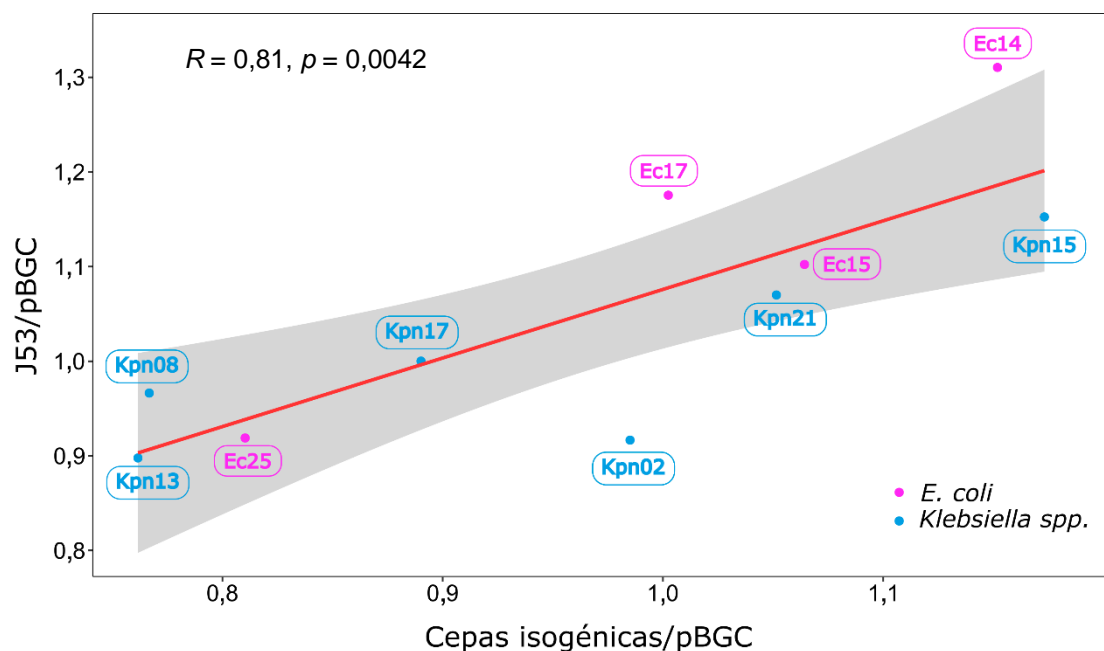
En el caso de las 8 cepas en las que no se pudo introducir el plásmido pBGC (Ec13, Kpn10, Kpn11 y Kpn19 a Kpn23), las cepas isogénicas con y sin pOXA-48 se compitieron contra *E.coli* J53 (ref.<sup>149</sup>; mutante resistente a azida sódica derivado de *E. coli* K-12) portadora del plásmido pBGC y se siguió el mismo protocolo descrito previamente. No se observó ninguna evidencia de inhibición del crecimiento entre las 8 cepas clínicas y *E. coli* J53 en los datos de citometría y los datos obtenidos de *fitness* relativo en estas competiciones fueron comparables a los obtenidos en las competiciones entre cepas isogénicas ( $t$  test de dos colas,  $t=1,65$ ,  $df=11,2$ ,  $P=0,13$ ).



**Figura 10. Distribución de los efectos de *fitness* de pBGC.** *Fitness* relativo ( $w$ ) de los clones portadores de GFP comparado con el de los clones libres del plásmido, obtenidos mediante ensayos de competición ( $n=5$  réplicas independientes; en rosa, *E. coli* y en azul, *Klebsiella spp.*). Los valores por debajo de 1 indican una reducción en  $w$  y valores superiores a 1 indican un incremento en el  $w$  debido a la adquisición de pBGC. Las barras representan la media de las cinco réplicas biológicas independientes y las barras de error representan los errores estándar de la media. Cabe destacar que los efectos de *fitness* de pBGC no correlacionan con los observados para pOXA-48 (Correlación de Pearson,  $R=0,11$ ,  $t=0,66$ ,  $df=39$ ,  $P=0,51$ ).

Para confirmar que ambos tipos de competiciones dan lugar a resultados similares, se seleccionaron 10 aislados al azar de los 42 cuyos datos de *fitness* se calcularon con competiciones isogénicas, y se repitieron las competiciones frente a *E. coli* J53/pBGC (Figura 11). Los resultados muestran una buena correlación entre los valores de *fitness* relativo, obtenidos con los dos tipos de competición. (correlación de Pearson,  $R=0,81$ ,  $t=3,96$ ,  $df=8$ ,  $P=0,004$ , Figura 11).

Finalmente, se realizaron controles para comprobar la posible transferencia por conjugación de pOXA-48\_K8 durante los ensayos de competición. Para ello, se plaquearon los tiempos finales de cada competición en amoxicilina-ácido clavulánico (con la concentración adecuada para cada aislado) y cloranfenicol 30 mg/L. No se detectaron transconjugantes en los controles, mostrando que la baja concentración inicial de los inóculos usados en las competiciones (10000 veces diluida) y la agitación energética del cultivo durante el ensayo previenen la conjugación de pOXA-48\_K8.



**Figura 11. Correlación entre los valores de *fitness* relativos calculados en competiciones frente a *E. coli* J53/pBGC y frente a clones isogénicos con pBGC.** Correlación entre los valores de *fitness* relativos obtenidos mediante ensayos de competición usando aislados isogénicos portadores de pBGC y usando *E. coli* J53 con pBGC en diez aislados diferentes. La línea roja representa la regresión lineal y el sombreado gris representa los intervalos de confianza del 95%. Los puntos azules corresponden a los aislados de *Klebsiella spp.* y los puntos rojos a los aislados de *E. coli*. Las etiquetas indican el nombre de cada aislado. También se indican el coeficiente de correlación de Pearson (R) y p-valor.

## Extracción de ADN y secuenciación del genoma

Para obtención del ADN genómico se sembraron estrías de cada cepa, con y sin el plásmido pOXA-48\_K8, en placas de LB agar suplementado o no con 0.5 mg/L de ertapenem, respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche y tras la incubación, se seleccionó una colonia independiente de cada tipo de aislado, con las que se inocularon tubos de 50 ml con 10 ml de LB. Los inóculos se incubaron a 37 °C y agitación constante hasta alcanzar una DO  $\approx 0,5$ . La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo indicado en el kit de purificación Wizard genomic DNA (Promega, WI, USA) y su cuantificación se realizó mediante el sistema QuantiFluor dsDNA (Promega, WI, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación del genoma completo fue realizada en el Wellcome Trust Centre for Human Genetics (Oxford, UK), usando la plataforma Illumina HiSeq4000 con 125 pares de bases (pb) por lectura “paired-end”. Algunos clones (Ec18, Kpn07, Kpn12 y Kpn15) fueron secuenciados de nuevo en MicrobesNG (Birmingham, UK), usando plataformas Illumina (MiSeq o HiSeq2500) con lecturas “paired-end” de 250 pb.

## Análisis bioinformáticos

Las lecturas de secuenciación de Illumina fueron trimadas usando la herramienta Trimmomatic v0.33<sup>150</sup>. Se usó SPAdes v3.9.0<sup>151</sup> para generar ensamblajes *de novo* a partir de las secuencias trimadas con el indicador -cov-cutoff fijado en “auto”. Se usó QUAST v4.6.0 ref.<sup>152</sup> para generar estadísticas de ensamblaje. Todos los ensamblajes *de novo* utilizados alcanzaron una calidad suficiente, incluyendo un tamaño total de 5-7 Mb, y el número total de contigs de

más de 1 kb era <200. Prokka v1.5<sup>153</sup> se utilizó para anotar los ensamblajes *de novo* con los genes predichos. Las lecturas y los genomas anotados fueron cargados en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) bajo el BioProject ID PRJNA641166. El secuenciotipo (ST) de siete genes fue determinado para todos los aislados usando la herramienta de tipificación de secuencias multilocus (<https://github.com/tseemann/mlst>) (Tabla 1). Los contenidos plasmídico y de genes de resistencia de cada genoma fueron caracterizados usando PlasmidFinder 2.1<sup>154</sup> y ResFinder 3.2<sup>155</sup>, respectivamente (Tabla 4).

La presencia de pOXA-48\_K8 se confirmó mediante el mapeo de las secuencias pertenecientes al plásmido pOXA-48\_K8 en los transconjugantes usando como referencia la secuencia completa del plásmido de la cepa donadora<sup>136</sup> (*K. pneumoniae\_k8*, número de acceso en GenBank MT441574). Se usó Snippy v3.1 (<https://github.com/tseemann/snippy>) para comprobar que no se había producido una acumulación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) o *indels* (inserciones/delecciones) en pOXA-48\_K8 durante la construcción de los transconjugantes. Las secuencias codificantes de pOXA-48\_K8 se predijeron y anotaron usando el software Prokka 1.14.6<sup>153</sup>.

**Tabla 4.** Contenido plasmídico y genes de resistencia de las cepas silvestres del estudio.

Nombre	Contenido plasmídico	Genes de resistencia
Ec01	Col-like, Incl, IncB/O/K/Z	<i>blaCTX-M-14, mdf(A)</i>
Ec02	Col-like, IncFIB, Incl, IncFIC, IncY	<i>aadA5, blaCTX-M-1, blaTEM-1B, dfrA17, sul2, tet(B), mdf(A)</i>
Ec03	Col-like, IncFIB, IncFII, IncB/O/K/Z	<i>blaCTX-M-14, blaTEM-1B, mdf(A)</i>
Ec04	Col-like, IncFIB, IncFII, IncFIA	<i>aadA5, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-14, blaTEM-1B, dfrA17, mph(A), sul1, sul2, tet(A), mdf(A)</i>
Ec05	Col-like, IncFII, Incl	<i>aadA5, blaCTX-M-1, sul2, tet(A), mdf(A)</i>
Ec06	Col-like, IncFII, Incl	<i>aadA5, blaCTX-M-1, sul2, tet(A), mdf(A)</i>
Ec07	Col-like, IncFIB, IncFII, Incl	<i>blaCTX-M-14, dfrA1, sul1, mdf(A)</i>
Ec08	Col-like, IncFIB, IncFII	<i>aac(3)-lid, blaCTX-M-15, blaTEM-1B, mdf(A)</i>
Ec09	Col-like, IncFII	<i>mdf(A), blaCTX-M-27</i>
Ec10	Col-like, IncFII, pEC4115	<i>aac(3)-lva, aph(3'')-lb, aph(4)-la, aph(6)-ld, blaCTX-M-1, mph(A), mdf(A)</i>
Ec11	Col-like, Incl, IncY	<i>aadA5, blaCTX-M-14, dfrA17, mph(A), sul1, mdf(A)</i>
Ec12	Col-like, IncX, Incl, p0111	<i>aadA2, blaSHV-12, cmlA1, sul3, tet(A), mdf(A), oqxA, oqxB</i>
Ec13	Col-like, IncFIB, IncFII, IncX, IncFIC	<i>aac(3)-lid, aadA5, aph(3'')-lb, aph(3)-lia, aph(6)-ld, blaCTX-M-55, floR, dfrA17, mph(A), sul1, sul2, tet(A), mdf(A)</i>
Ec14	Col-like, IncFIB, IncFII	<i>aac(3)-lid, aadA2, blaCTX-M-32, cmlA1, sul3, tet(B), mdf(A)</i>
Ec15	Col-like, IncFIB, IncX, IncFIA, IncFIC	<i>aac(6)-lb-cr, blaCTX-M-15, blaOXA-1, catA1, mdf(A)</i>
Ec16	Col-like, Incl, p0111	<i>blaCTX-M-14, mdf(A)</i>
Ec17	Col-like	<i>blaCTX-M-14, mdf(A)</i>
Ec18	Col-like, IncY	<i>aadA5, blaCTX-M-14, dfrA17, mph(A), sul1, mdf(A)</i>
Ec19	Col-like, IncY	<i>aadA5, blaCTX-M-14, dfrA17, mph(A), sul1, mdf(A)</i>
Ec20	IncFIB, Incl, IncFIA, IncFIC	<i>aac(3)-lid, blaCTX-M-15, blaTEM-1B, mdf(A)</i>
Ec21	Col-like, IncFIB, IncFII, IncFIA, p0111	<i>aac(3)-lia, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, floR, sul2, tet(A), tet(B), mdf(A)</i>
Ec22	Col-like	<i>blaCTX-M-14, mdf(A)</i>
Ec23	Col-like, Incl, p0111	<i>aadA2, aph(3'')-lb, blaSHV-12, cmlA1, sul3, tet(A), mdf(A)</i>
Ec24	IncB/O/K/Z	<i>aph(6)-ld, blaCTX-M-14, dfrA1, sul2, tet(A), mdf(A)</i>
Ec25	IncFIB, IncFII, IncX, IncFIC	<i>aph(3)-la, aph(6)-ld, blaCTX-M-3, dfrA14, fosA3, sul2, mdf(A)</i>
Kpn01	IncFII, IncFIA	<i>aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaSHV-187, dfrA14, fosA, qnrB1, sul2, oqxA, oqxB</i>
Kpn02	Col-like, IncFIB, IncFII	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-106, blaTEM-1B, dfrA14, fosA6, qnrB1, sul2, tet(A), oqxA, oqxB</i>
Kpn03	Col-like, IncFIB, IncFII, IncFIA, IncHI1B	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-187, blaTEM-1B, dfrA14, fosA, qnrB1, sul2, tet(A), oqxA, oqxB</i>
Kpn04	IncFIB, IncFII, IncX, IncFIA, IncHI1B	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-187, blaTEM-1B, dfrA14, fosA, qnrB1, sul2, tet(A), oqxA, oqxB</i>
Kpn05	Col-like, IncFIB, IncFII	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaOXA-1, qnrB1, oqxA, oqxB</i>
Kpn06	Col-like, IncFIB, IncFII, IncX	<i>aph(3'')-lb, aph(3)-la, aph(6)-ld, fosA6, qnrS1, sul1, oqxA, oqxB</i>
Kpn07	IncFIB, IncFII, IncR	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aadA2, aph(3)-lb, aph(3)-la, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-182, blaTEM-1B, catA1, dfrA12, fosA6, mph(A), qnrB1, sul1, sul2, oqxA, oqxB</i>
Kpn08	Col-like, IncFII, IncFIA, IncHI1B	<i>aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaSHV-187, blaTEM-1B, dfrA14, fosA, qnrB1, sul2, tet(A), oqxA, oqxB</i>
Kpn09	Col-like, IncFIB	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aph(3)-la, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-110, dfrA15, fosA, sul1, tet(A), oqxA, oqxB</i>
Kpn10	IncFIB, IncFII	<i>aac(6)-lb-cr, aadA2, aph(3)-la, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-106, blaTEM-1B, dfrA12, fosA6, tet(A), oqxA, oqxB</i>
Kpn11	Col-like, IncFIB, IncFII, IncX, IncR	<i>blaCTX-M-10, blaOKP-A-12, fosA6, oqxA, oqxB</i>
Kpn12	Col-like, IncFIB, IncX	<i>blaOKP-B-3, blaSHV-12, fosA6, qnrS1, oqxA, oqxB</i>
Kpn13	Col-like, IncFII, IncFIA, IncHI1B	<i>aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaSHV-187, blaTEM-1B, dfrA14, fosA, qnrB1, sul2, oqxA, oqxB</i>
Kpn14	Col-like, IncFIB, IncFII	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-106, blaTEM-1B, dfrA14, fosA6, qnrB1, sul2, tet(A), oqxA, oqxB</i>
Kpn15	IncFIB, IncFII, IncX, IncR	<i>blaCTX-M-10, blaOKP-A-12, fosA6, oqxA, oqxB</i>
Kpn16	Col-like, IncFIB, Incl	<i>aadA5, blaCTX-M-1, blaLEN26, dfrA17, fosA, sul2, oqxA, oqxB</i>
Kpn17	IncFIB, IncFII	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-106, blaTEM-1B, dfrA14, fosA6, qnrB1, sul2, tet(A), oqxA, oqxB</i>
Kpn18	Col-like	<i>blaSHV-106, fosA6, qnrS1, oqxA, oqxB</i>
Kpn19	IncFII, IncX, IncFIA	<i>aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaTEM-1B, dfrA14, qnrB1, sul2, oqxA, oqxB</i>
Kpn20	Col-like, IncFIB, IncFII, IncR	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-182, blaTEM-1B, catA2, fosA6, qnrB1, sul2, oqxA, oqxB</i>
Kpn21	Col-like, IncFIB	<i>aadA2, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaCTX-M-15, blaSHV-60, catA2, dfrA12, fosA, mph(A), qnrS1, sul1, sul2, tet(A), oqxA, oqxB</i>
Kpn22	Col-like, IncFIB, IncFII, IncR	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aadA2, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaSHV-182, catA1, dfrA12, fosA6, qnrB1, sul1, oqxA, oqxB</i>
Kpn23	Col-like, IncFIB, IncFII, IncR	<i>aac(3)-lia, aac(6)-lb-cr, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, blaOXA-1, blaSHV-182, blaTEM-1B, catA2, fosA6, qnrB1, sul2, oqxA, oqxB</i>
Kpn24	Col-like, IncFIB, IncX	<i>fosA6, qnrS1, oqxA, oqxB, blaSHV-12</i>
Kpn25	Col-like, IncFIB, IncX	<i>fosA6, qnrS1, oqxA, oqxB, blaSHV-12</i>

Las distancias entre los genomas se determinaron con Mash v2.0<sup>156</sup> con las lecturas de la secuencia en bruto, y la filogenia fue construida con mashtree v0.33<sup>157</sup>. Para el análisis de los genomas core se calculó el parentesco genético de los aislados provenientes de *Klebsiella spp.* y de *E. coli* reconstruyendo la filogenia de su genoma core con un alineamiento de los SNPs obtenido con Snippy v3.1 (<https://github.com/tseemann/snippy>). Se generó un árbol de máxima verosimilitud utilizando IQ-TREE con detección automática del mejor modelo evolutivo<sup>158</sup>. El árbol fue representado con la raíz en el punto medio utilizando el paquete *phytotools* de R (<https://github.com/helixcn/phytools>) y visualizado con la herramienta iTOL<sup>159</sup>. También se construyó una matriz de distancia de los genes accesorios para analizar el genoma accesorio<sup>160</sup>. Para ello, se usó AccNET, una herramienta que permite inferir el genoma accesorio de proteomas y los agrupa basándose en su similitud de las proteínas. El conjunto de proteínas representativas se usó para construir una matriz binaria (presencia/ausencia de proteínas en el genoma accesorio) en R y un cladograma para clasificar las cepas según los genomas accesorios. La distancia euclidiana se calculó mediante la función “dist” y se realizó una agrupación jerárquica con UPGMA utilizando la función “hclust” en R. Este cladograma fue representado con la raíz del punto medio utilizando el paquete *phytools* en R (<https://github.com/helixcn/phytools>) y visualizado usando la herramienta iTOL<sup>159</sup>.

### **Análisis de la distribución de los efectos de *fitness* del plásmido a través de la filogenia bacteriana.**

Se exploró la relación entre los efectos de *fitness* determinados experimentalmente y la filogenia de la colección de transconjugantes, analizando sus genomas core y accesorios. Para ello se llevaron a cabo varias pruebas estadísticas disponibles en el paquete *phylosignal*<sup>161</sup> de R. Estos análisis están diseñados para identificar dependencia estadística entre una variable continua (*fitness* relativo) y el árbol filogenético de los taxones en los que se ha introducido dicha característica. Por lo tanto, una señal filogenética positiva indica que hay una tendencia a que los taxones relacionados se parezcan entre sí con respecto a la variable continua<sup>162</sup>.

Se han propuesto varios índices para identificar señal filogenética, pero la elección entre ellos no es sencilla<sup>163</sup>. En primer lugar, evaluamos los métodos implementados en la función *phyloSignal* que producen medidas globales de la señal filogenética (es decir, en toda la filogenia). Los métodos empleados fueron el  $C_{mean}$  de Abouheif, el índice  $I$  de Moran,  $K$  y  $K^*$  de Bloomberg, y  $\lambda$  de Pagel<sup>161</sup>. Todos los métodos excepto el  $\lambda$  de Pagel detectaron una señal filogenética significativa marginal en los genomas core de *K. pneumoniae* ( $0,11 > P > 0,02$ ). El  $C_{mean}$  de Abouheif y el índice  $I$  de Moran, también detectaron una señal filogenética marginal en el árbol del genoma accesorio de *K. pneumoniae* ( $P > 0.056$  en ambos casos). Finalmente usamos el Indicador Local de Asociación Filogenética (LIPA) basado en el índice  $I$  de Moran local, que está destinado a detectar puntos calientes locales de señal filogenética<sup>161,164</sup>. LIPA, implementado en la función *lipaMoran*, calcula los índices  $I$  locales de Moran para cada extremo

de la filogenia y una prueba no-paramétrica para determinar la significancia estadística.

Para investigar la relación entre los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 y el contenido de plásmidos de cada cepa, se realizó un análisis factorial de datos mixtos (FAMD) usando el paquete *FactoMine* de R<sup>165</sup>.

### Modelo de la dinámica poblacional de plásmidos.

Se utilizó un modelo matemático simple de crecimiento microbiano bajo limitación de recursos para estudiar el papel de la distribución de efectos de *fitness* (DEF) en la dinámica ecológica de propagación de un plásmido en una población bacteriana<sup>74</sup>. La tasa de crecimiento bacteriano se modelizó como una función saturante de la concentración de recursos,  $R$ ,

$$G(R) = \rho \cdot \frac{V_{max}R}{K_m + R} = \rho \cdot u(R), \quad (1)$$

donde  $\rho$  representa la eficiencia de las células para convertir las moléculas de recurso en biomasa y  $u(R)$  una función de absorción de recursos que depende de la tasa de absorción máxima ( $V_{max}$ ) y de la constante de saturación media ( $K_m$ ). Si se definen como  $B_p$  y  $B_0$  las densidades de células portadoras y libres del plásmido respectivamente (cada una con sus propios parámetros cinéticos y funciones de crecimiento denominadas  $G_p(R)$  y  $G_0(R)$ , respectivamente), entonces la densidad de cada subpoblación puede describirse mediante un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\frac{dR}{dt} = -u_p(R) - u_0(R) - dR, \quad (2)$$

$$\frac{dB_p}{dt} = (1 - \lambda)G_p(R)B_p + \gamma B_0 B_p - dB_p, \quad (3)$$

$$\frac{dB_0}{dt} = G_0(R)B_0 + \lambda G_p(R)B_p - \gamma B_0 B_p - dB_0, \quad (4)$$

donde  $\lambda$  representa la tasa de pérdida por segregación del plásmido.

Además, se representa como  $\gamma$  la tasa de transferencia por conjugación, por lo que se modeliza la conjugación del plásmido en función de las densidades de células donadoras y receptoras. Al resolver numéricamente el sistema de ecuaciones (con Matlab), se obtiene la densidad final de cada tipo bacteriano en un experimento de  $T = 24$  unidades de tiempo con  $d = 0$  (para reproducir las condiciones cultivo usadas para la determinación experimental de la DEF).

### Parametrización del modelo

Los parámetros del modelo de dinámica de poblaciones se determinaron conjuntamente utilizando un método Monte Carlo basado en cadenas de Markov (MCMC) con el algoritmo Metropolis-Hastings (*scripts* codificados en R y disponibles en un repositorio público<sup>166</sup>) y ajustando un modelo simple de Monod descrito por la afinidad específica por los recursos ( $V_{max}/K_m$ ) y por su tasa de conversión ( $\rho$ ) a las curvas de crecimiento realizadas experimentalmente con cada aislado con y sin el plásmido pOXA-48\_K8. Este algoritmo de ajuste de datos implementa una herramienta de muestreo Metropolis-Hastings que se

ejecutó durante  $1 \times 10^7$  repeticiones, con un parámetro de quemado de 0,2 y un adelgazamiento de 100 repeticiones. En este trabajo se usa un método de varianza de propuesta adaptativa como primer paso del algoritmo MCMC para ajustar las probabilidades de aceptación de las actualizaciones propuestas. Durante este periodo no se almacenaron muestras en la cadena hasta que el ratio de aceptación alcanzó un valor objetivo, entonces se fijó la varianza de la propuesta y se comenzó a almacenar las repeticiones MCMC. Los trazos de las cadenas presentaron una buena mezcla, verificándose la convergencia de las cadenas de Markov mediante la obtención de valores estadísticos de Gelman-Rubin Rhat cercanos a uno para todas las cepas. Se evaluó la solidez a diferentes distribuciones *a priori* considerando las distribuciones uniforme, lognormal, beta y gamma, y obteniendo estimaciones de máxima verosimilitud similares para todas las distribuciones *a priori*. La idoneidad de los parámetros se confirmó utilizando un algoritmo de clonación de datos<sup>167,168</sup> de forma que, a medida que aumenta el número de clones, la distribución posterior marginal converge con la estimación de máxima verosimilitud. Los datos y *scripts* necesarios para la producción de gráficos de diagnóstico MCMC se encuentran disponibles en <http://www.github.com/ccg-esb/pOXA48/>.

### Simulaciones estocásticas de comunidades polimicrobianas.

Los experimentos numéricos se realizaron mediante el muestreo aleatorio de  $N = 1 \times 10^4$  células de los parámetros de distribución obtenidos tras aplicar el algoritmo MCMC a las 50 cepas del estudio y ajustando a una distribución normal bivariante. Después se ensamblaron 5000 comunidades sintéticas compuestas por un subconjunto aleatorio de  $M < N$  cepas diferentes muestreadas de la distribución, y se resolvió una extensión policlonal del modelo de dinámica de poblaciones. Para cada experimento numérico, la densidad total de la cepa  $i$  sería  $B^i(t) = B_p^i(t) + B_0^i(t)$ , donde  $B_p^i$  y  $B_0^i$  representan, respectivamente, las densidades de células con y sin plásmido de tipo  $1 \leq i \leq M$ . Para modelizar los efectos de *fitness* asociados a la presencia de los plásmidos, se introdujo el parámetro  $\sigma$ , de forma que cuando  $\sigma = 0$ , la diferencia de *fitness* entre  $B_p^i$  y  $B_0^i$  corresponde a una reducción fija de la tasa de crecimiento (de acuerdo con una DEF con varianza 0 y media  $w = 0,985$ ). Por el contrario, cuando  $\sigma > 0$ , los parámetros cinéticos de crecimiento de cada cepa de la comunidad se determinaron muestreando a partir de una distribución normal,  $N(0, \sigma^2)$ , y multiplicando tanto  $V_{\max}^i$  como  $\rho^i$  por un factor de  $(1 + s_i)$ .

Al igual que en el modelo con una única cepa bacteriana en la población, se consideró la pérdida del plásmido por segregación como una transición de  $B_p^i$  a  $B_0^i$  que sucede a una tasa  $\lambda$ . Sin embargo, en esta ocasión, también se considera que las células libres del plásmido son capaces de adquirir el plásmido por conjugación de otra cepa portadora del plásmido de la comunidad, con una tasa  $\gamma$  constante, y con igual probabilidad de transferirse entre distintos hospedadores bacterianos. De esta forma, se obtiene un sistema de ecuaciones diferenciales  $2M + 1$  que pueden escribirse, para cada cepa  $i$ , de la siguiente forma:

$$\frac{dB_p^i}{dt} = (1 - \lambda)G_p^i(R)B_p^i + \gamma \sum_{j=1}^M B_p^j B_0^i - dB_p^i, \quad (5)$$

$$\frac{dB_0^i}{dt} = G_0^i(R)B_0^i + \lambda G_p^i(R)B_p^i - \gamma \sum_{j=1}^M B_p^j B_0^i - dB_0^i \quad (6)$$

Además, si  $\hat{R}$  representa la entrada de recursos en el sistema,

$$\frac{dR}{dt} = - \sum_{i=1}^M (u_p^i(R) + u_0^i(R)) - d(R - \hat{R}). \quad (7)$$

Las densidades bacterianas iniciales fueron determinadas corriendo el sistema primero (con las cepas presentes inicialmente a la misma densidad) durante  $T = 24$  unidades de tiempo, y eliminando todas las células libres de plásmido de la población. Este supuesto es compatible con pacientes que reciben tratamiento antibiótico que elimina todas las bacterias sensibles (libres de plásmido que aporte resistencia a dicho antibiótico) de la microbiota o, en un entorno experimental, a un ciclo de crecimiento en medio selectivo tras un cultivo durante la noche. Dado el interés en esta tesis doctoral por las dinámicas poblacionales a largo plazo, se corrió cada simulación empezando desde la condición inicial mencionada arriba hasta que: i) la fracción de plásmidos se encontrara por debajo de un umbral  $\epsilon > 0$ , es decir, hasta la extinción del plásmido; ii) la fracción de plásmido estuviera cerca de 100% y la densidad total de células libres de plásmido fuera inferior a  $\epsilon$ , es decir, hasta la fijación del plásmido; o iii) hasta que aparecieran subpoblaciones de células libres del plásmido y subpoblaciones de células con plásmido que coexistieran indefinidamente en la comunidad (población en equilibrio o con un comportamiento oscilatorio).

### Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en sólido.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de AMC, ertapenem (ERT), imipenem (IMP) y meropenem (MER) en la colección de aislados clínicos, con y sin pOXA-48\_K8, se llevó a cabo siguiendo el protocolo de dilución en agar<sup>169,170</sup> modificado. La principal ventaja de este método es que permite probar un gran número de aislados bacterianos simultáneamente y en idénticas condiciones. Por otro lado, permitió probar un amplio rango de concentraciones de AMC, un antibiótico  $\beta$ -lactámico que se degrada con rapidez en medio líquido<sup>171</sup>.

Todos los aislados de la colección, con y sin el plásmido, fueron estriados a partir de glicerol en placas de LB agar suplementado o no, respectivamente, con ERT 0,5 mg/L. Una colonia independiente de cada cepa fue inoculada en 200  $\mu$ l de LB líquido en placas de 96 pocillos e incubadas a 37 °C durante la noche. Tras la incubación, se realizó una dilución 1:1000 de todos los cultivos en LB fresco, en una placa de 96 pocillos.

Los cultivos diluidos se sembraron, con ayuda de una pipeta multicanal, como gotas de 10  $\mu$ l en distintas placas Petri de 120 x 120 mm con LB agar, cada una de ellas suplementada con una concentración distinta del antibiótico de

estudio: AMC (de 4 mg/L a 32.768 mg/L), ERT (de 0,25 mg/L a 512 mg/L), IMP (de 0,25 mg/L a 1.024 mg/L) o MER (de 0,25 mg/L a 32 mg/L). Los distintos aislados fueron también sembrados en LB agar, sin selección antibiótica, a modo de control de crecimiento. De esta forma en cada placa se sembraron hasta 50 aislados al mismo tiempo. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante la noche. Tras la incubación, se observó el crecimiento y se determinó el valor de CMI para cada clon como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible de cada cepa de estudio. A partir de los niveles de resistencia constitutivo y adquirido por la presencia de pOXA-48\_K8 de cada cepa, se calculó el incremento del nivel de resistencia a cada antibiótico, asociado a la adquisición del plásmido, mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta \text{ nivel de resistencia} = \frac{\text{CMI}_{\text{pOXA-48+}}}{\text{CMI}_{\text{pOXA-48-}}}$$

donde  $\text{CMI}_{\text{pOXA-48+}}$  es el nivel de resistencia de cada cepa a cada antibiótico tras la adquisición de pOXA-48\_K8; y  $\text{CMI}_{\text{pOXA-48-}}$  es el nivel de resistencia constitutivo de cada cepa a cada antibiótico, previo a la adquisición del plásmido.

### Determinación del número de copias del plásmido.

Se determinó el número de copias del plásmido (NCP) pOXA-48 en 33 aislados de la colección de transconjugantes portadores de pOXA-48\_K8 obtenida en esta tesis doctoral (*E. coli*, n = 15; *Klebsiella spp.* n = 18). Cabe destacar que, debido a la presencia de mutaciones en el gen que codifica la proteína de replicación RepA, se descartaron 17 cepas transconjugantes del estudio del NCP (*E. coli* = 10; *Klebsiella spp.* = 7). También se determinó el NCP pOXA-48 en 200 cepas naturales portadoras de variantes de pOXA-48 que comparten al menos el 72% del genoma de pOXA-48\_K8 (*E. coli*, n = 59; *Klebsiella spp.* n = 140) caracterizadas recientemente en nuestro grupo<sup>136</sup>.

La determinación del NCP se realizó a partir de los datos de secuenciación genómica como el ratio entre la mediana de la profundidad de secuenciación del plásmido pOXA-48 y la mediana de la profundidad de secuenciación del cromosoma del hospedador<sup>172-174</sup>. Dado que los ensamblajes del genoma están fragmentados, la mediana de la profundidad de secuencia del cromosoma se calculó a partir de los tres *contigs* de mayor tamaño, cuya correspondencia con las secuencias cromosómicas se confirmó usando BLASTn frente a la base de datos del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI). La mediana de la profundidad de secuenciación de pOXA-48 se calculó a partir del *contig* que contiene el replicón IncL, identificado con ABRicate v1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>) con la base de datos PlasmidFinder. Este *contig* de pOXA-48 generalmente corresponde con el *contig* más largo del plásmido. Para calcular el NCP, las lecturas trimadas se mapearon primero con su respectivo ensamblaje genómico utilizando BWA MEM V0.7.17<sup>175</sup>. Se utilizó Samtools Depth v1.12<sup>176</sup> con la opción -a para obtener las profundidades de lectura en cada posición genómica y se calculó la mediana de la profundidad de secuencia para pOXA-48 y para el cromosoma con GNU datamash v1.4 (<https://www.gnu.org/software/datamash/>).

### Determinación de frecuencias de conjugación *in vitro*.

Para determinar la permisividad en la captación del plásmido pOXA-48\_K8 por conjugación de las especies incluidas en esta tesis doctoral, se midieron las frecuencias de conjugación de un subconjunto de 10 *E. coli* (Ec02, Ec03, Ec07, Ec10, Ec12, Ec16, Ec19, Ec21, Ec22 y Ec25) y 10 *Klebsiella spp.* (Kpn01, Kpn02, Kpn05, Kpn10, Kpn13, Kpn14, Kpn15, Kpn17, Kpn19 y Kpn21) de la colección de cepas silvestres (sin pOXA-48), que fueron usadas como receptores de la conjugación. Como donadores del plásmido, se usaron tres cepas portadoras de pOXA-48\_K8 diferentes: *E. coli*  $\beta$ 3914/pOXA-48\_K8, una cepa de laboratorio auxótrofa para DAP, descrita previamente; la cepa silvestre *K. pneumoniae* ST11, K93<sup>72</sup>; y la cepa silvestre *E. coli* ST10, C165<sup>72</sup> (Tabla 1). Con el objetivo de facilitar la selección de receptores y transconjugantes, los 10 aislados silvestres de *E. coli* y 7 de los aislados de *Klebsiella spp.* portaban a su vez el plásmido de fluorescencia, no movilizable pBGC, que codifica un gen de resistencia a cloranfenicol (descrito en el apartado *Construcción del plásmido pBGC*). Los 3 aislados del género *Klebsiella spp.* restantes, no portaban pBGC (Kpn10, Kpn19 y Kpn21).

Las conjugaciones se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente en el apartado *Construcción de la colección de transconjugantes*. Donadores y receptores fueron estriados de glicerol en placas de LB agar, con y sin ERT 0,5 mg/L respectivamente, e incubadas a 37 °C durante la noche. Tras la incubación, colonias independientes de cada cepa donadora y receptora fueron inoculadas, por separado, en 2 ml de LB líquido en tubos de cultivo de 15 ml. Los tubos inoculados se incubaron a 37 °C con agitación constante (250 r.p.m.) durante la noche, tiempo tras el cual, los cultivos de cada cepa donadora y receptora fueron mezclados en proporción 1:1 (cada donador con cada receptor, de forma independiente, hasta un total de 4 réplicas biológicas de receptor por cada donador). Cada reacción de conjugación fue sembrada, en forma de gota de 50  $\mu$ l, en una placa de LB agar (suplementado con DAP 0,3 Mm, en el caso del donador *E. coli*  $\beta$ 3914/pOXA-48\_K8) e incubada a 37 °C durante 4 h. Cabe señalar, que este tiempo de incubación se seleccionó con el objetivo de obtener una biomasa visible y evitar a su vez eventos de transferencia secundaria (transmisión del plásmido de transconjugantes a receptores). Tras la incubación, la biomasa visible resultante se re suspendió en 1 ml de solución salina NaCl 0,9 % y se realizaron diluciones seriadas 1/10 hasta la dilución 1/10<sup>6</sup>.

Para estimar las densidades finales de transconjugantes y receptores de cada reacción, se sembraron 10  $\mu$ l de cada dilución en placas de HiCrome™ UTI agar (HIMEDIA laboratories, India) con y sin AMC (256 mg/L), respectivamente, y con cloranfenicol (50 mg/L). Las diluciones se sembraron en forma de gota, y cada gota se dejó escurrir, posteriormente, por la placa. Esta técnica permite separar las células de forma que son fácilmente distinguibles y cuantificables. La contra selección de los donadores se realiza por la ausencia de DAP en el medio (*E. coli*  $\beta$ 3914/pOXA-48\_K8) y por la selección con cloranfenicol (*K. pneumoniae*

ST11 y *E. coli* ST10 clínicas). Las *frecuencias de conjugación* por receptor se calcularon siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia conjugación}_R = \frac{\text{UFC}_{\text{transconjugantes}}}{\text{UFC}_{\text{totales}}}$$

donde UFC/ml<sub>transconjugantes</sub> son las unidades formadoras de colonias de transconjugantes, obtenidas a partir del número de colonias contadas en la placa y el factor de dilución; y UFC/ml<sub>totales</sub> son las unidades formadoras de colonias de receptores, tras restar los transconjugantes. En los casos en los que no se detectaron colonias de transconjugantes en ninguna de las diluciones sembradas, se calculó una tasa de conjugación umbral suponiendo la presencia de una única colonia en el total de la suspensión celular, estableciéndose así un límite de detección de 10<sup>-6</sup>.

Para la realización de ensayos de conjugación con dos receptores al mismo tiempo, se modificó el protocolo anterior, de forma que la mezcla de conjugación se compone de dos receptores, en iguales proporciones. Se formaron, al azar, parejas de receptores compuestas por una cepa receptora de cada especie. Los pre cultivos de cada receptor se mezclaron en proporción 1:1 y esta mezcla de receptores fue a su vez mezclada en proporción 1:1 con el pre cultivo del donador para dar lugar a la reacción de conjugación final. La reacción de conjugación fue sembrada e incubada siguiendo el protocolo de las conjugaciones con un único receptor. Las densidades de receptores y transconjugantes se determinan mediante selección antibiótica con AMC 256 mg/L (para seleccionar transconjugantes frente a receptores) y cloranfenicol 50 mg/L (para contra seleccionar donadores). La distinción entre los receptores integrantes de la reacción se lleva a cabo gracias a la utilización del medio diferencial cromogénico HiCrome™ UTI agar (HIMEDIA laboratories, India), de forma que las colonias de *E. coli* se observaran en color rosa y las pertenecientes a *Klebsiella spp.*, en azul. La frecuencia de conjugación de cada receptor se realiza utilizando la fórmula indicada arriba.

Los ensayos de conjugación en *pool* se llevaron a cabo mezclando todos los aislados receptores, de ambas especies, en la misma proporción. A esta mezcla se añadió el cultivo donador en proporción 1:1. La determinación de las densidades de transconjugantes y receptores, así como la contra selección del donador, se realizan siguiendo el protocolo previamente descrito.

Dado que en el caso de las tres cepas receptoras no portadoras de pBGC (Kpn10, Kpn19 y Kpn21), fue imposible realizar la contra selección del donador clínico *K. pneumoniae* ST11, ni mediante selección antibiótica ni mediante la distinción por el color de las colonias, no se registraron datos de conjugación de estos tres aislados receptores con *K. pneumoniae* ST11 como donador, en ninguna de las modalidades de conjugación previamente descritas.

### **Determinación de frecuencias de conjugación *in vivo***

Para la determinación de las frecuencias de conjugación de pOXA-48\_K8 en aislados clínicos *in vivo*, se llevaron a cabo ensayos de conjugación utilizando

un modelo de colonización intestinal en ratón. Estos ensayos se realizaron en dos ocasiones, con una separación en el tiempo de 3 meses y con idénticas condiciones. En este apartado se detalla el protocolo de uno de ellos, extensible al segundo.

*Modelo de ratón y condiciones de alojamiento.* Los experimentos se llevaron a cabo con hembras de ratón (n=21) C57BL/6J de 6 semanas de edad (Charles River Laboratories, UK), alojadas con comida estéril y agua acidificada (un total de 42 ratones, 21 por experimento). Para eliminar la microbiota residente, los ratones recibieron un tratamiento antibiótico de una semana de duración a base de ampicilina (400 mg/L), vancomicina (1 mg/L) y neomicina (0,5 mg/L), administrado a través del agua de beber. Durante el tratamiento antibiótico, los ratones se mantuvieron en tres jaulas, a razón de 7 ratones por jaula. Pasada la semana, se retiró el tratamiento antibiótico del agua y los ratones fueron separados en jaulas individuales, para evitar la contaminación de microbiotas entre ratones, por coprofagia, durante el experimento.

*Cepas bacterianas e infección de los ratones.* Para los ensayos de conjugación *in vivo* se seleccionaron como receptores 6 aislados silvestres portadores de pBGC del grupo usado en los ensayos *in vitro*, 3 *E. coli* (Ec10, Ec12 y Ec21) y 3 *Klebsiella spp.* (Kpn05, Kpn 14 y Kpn17). Estos aislados representaban la variabilidad de frecuencias de conjugación observadas en cada especie. Como donador, se seleccionó la cepa clínica portadora de pOXA-48\_K8, *K. pneumoniae* ST11, K93. Un día después de la finalización del tratamiento antibiótico, 18 de los 21 ratones fueron infectados, por medio de una sonda orogástrica, con una solución con  $10^7$  UFC de la cepa donadora. Una hora más tarde, cada ratón infectado con el donador fue coinfectado, por el mismo método, con una solución con  $10^7$  UFC de un receptor, a razón de 3 ratones por receptor (cada uno de los 3 ratones, procedente de una jaula inicial distinta). De esta forma, de los 21 ratones empleados en el ensayo, 18 ratones fueron infectados con donador y receptor (6 receptores distintos, 3 ratones por receptor) y 3 ratones permanecieron sin infectar a modo de control.

*Recogida de muestras y determinación de densidades bacterianas.* Una vez finalizado el tratamiento antibiótico, y con anterioridad a la infección, se recogieron muestras fecales frescas de cada ratón como control de la eliminación de la microbiota residente. Las heces fueron pesadas y re suspendidas en 1 ml de PBS estéril con ayuda de un vórtex hasta conseguir una mezcla homogénea. Estas mezclas fueron diluidas 1:100000 y 100  $\mu$ l de cada una de ellas fueron sembrados en placas de LB agar con ampicilina (400 mg/L) y vancomicina (1 mg/L) e incubadas a 37 °C durante la noche. Tras la incubación, se comprobó la ausencia de crecimiento bacteriano. Durante el ensayo, se tomaron muestras de heces frescas de cada ratón a las 24 h y 48 h tras la infección con las cepas donadora y receptora. Las muestras fueron procesadas de la forma descrita previamente y se realizaron diluciones seriadas con los homogeneizados fecales en PBS. Para determinar las densidades celulares de donadores, receptores y transconjugantes, se sembraron 100  $\mu$ l de las diluciones 1:10000, 1:100000 y 1:1000000 en placas de LB agar suplementadas con: i) vancomicina (1 mg/L) y

AMC (256 mg/L) para la detección de donadores; ii) vancomicina (1mg/L) y cloranfenicol (50 mg/L) para detectar receptores; iii) y vancomicina (1mg/L), AMC (256 mg/L) y cloranfenicol (50 mg/L) para determinar la presencia de transconjugantes. Los niveles de colonización de las cepas integrantes de cada conjugación (Figura 20a, c y e), expresados en UFC/ mg de heces se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$UFC / mg_{donador,receptor} = \frac{UFC_{donador,receptor} - UFC_{transconjugantes}}{mg_{heces}}$$

A su vez, las frecuencias de conjugación por receptor se calculan a partir de las UFC/mg de transconjugantes y receptores, usando la ecuación descrita en el apartado anterior (ver Ensayos de conjugación *in vitro*). A las 48 h tras la infección, tras la recogida de heces frescas, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron muestras del contenido del ciego mediante extrusión manual. El procesamiento del material fecal de ciego, así como la determinación de las densidades celulares (Figura 20a, c y e) y el cálculo de la frecuencia de conjugación, se realizaron de la misma forma que en heces, tal y como se describe arriba.

### Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando R (v. 4.2.1). Se usó la correlación de Pearson para evaluar la relación lineal entre los parámetros de las curvas de crecimiento y los valores de *fitness* relativos obtenidos en ensayos de competición, y entre los valores de *fitness* relativos obtenidos de las competiciones entre cepas isogénicas y las que se realizaron usando J53/pBGC como competidor común. Para comprobar la normalidad de la distribución de todos los datos de este trabajo, se realizaron test de normalidad Shapiro-Wilk. Dada la distribución normal de los valores de *fitness* relativo, se usaron la prueba ANOVA de dos vías y la prueba *post hoc* Tukey-Kramer de diferencia significativa para evaluar la reducción en el *fitness* asociada con la presencia de pOXA-48 y las diferencias en los valores de *fitness* relativo entre especies. Se usó el *t* test de dos muestras con corrección Bonferroni para determinar la significancia de efectos de *fitness* asociados a pOXA-48\_K8 en los diferentes hospedadores. Para comparar la distribución de los efectos de *fitness* obtenidos en este estudio con los obtenidos en un metaanálisis realizado por Vogwill y MacLean<sup>177</sup> (no normalmente distribuidos; test de normalidad Shapiro-Wilk,  $P= 0.0006$ ), se usó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Esta prueba estadística se usó también para determinar las diferencias entre especies de las  $DO_{max}$ ,  $\mu_{max}$  y AUC relativas extraídas de las curvas de crecimiento (test de normalidad Shapiro-Wilk,  $P < 0,004$  para todos los parámetros excepto para la  $\mu_{max}$  de *Klebsiella spp.*, donde  $P=0.215$ ). Para determinar las diferencias en los parámetros de las curvas de crecimiento entre los aislados con y sin el pOXA-48\_K8, se realizaron pruebas de rangos con signo de Wilcoxon pareadas con corrección continua, para los aislados de *E.coli* y los de *Klebsiella spp.*

El análisis de las diferencias en los niveles de resistencia antibiótica entre las especies utilizadas en esta tesis doctoral (est de normalidad de Shapiro-Wilk,

$P < 0.01$ ), se realizó mediante el test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon.

Para determinar las diferencias de frecuencias de conjugación entre especies en los experimentos de conjugación “por parejas” (test de normalidad de Shapiro-Wilk,  $P < 0.01$  en todos los casos) se usó el test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon pareado. Para determinar las diferencias entre especies receptoras en los experimentos de conjugación con receptores por separado y en *pool* (test de normalidad de Shapiro-Wilk,  $P < 0.01$  en todos los casos), se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para la determinación de la influencia del donador en las frecuencias de conjugación observadas, se realizó una prueba *post-hoc* Tuckey-Kramer de diferencia significativa.



## RESULTADOS



Capítulo 1. Determinación de la distribución de los efectos de *fitness* del plásmido pOXA-48 en un conjunto de enterobacterias ecológicamente compatibles



Esta tesis doctoral se presenta en formato de resultados, no obstante, este capítulo forma parte de un trabajo publicado en la revista *Nature Communications* en el año 2021 bajo el título “Variability of plasmid fitness effects contributes to plasmid persistence in bacterial communities”. El artículo completo se adjunta como [Anexo](#) en este manuscrito.

Los plásmidos son elementos genéticos extra cromosómicos capaces de transferirse entre bacterias mediante la conjugación, que a menudo portan genes accesorios que pueden ayudar a sus hospedadores bacterianos a adaptarse a un sinfín de entornos, desempeñando un papel clave en la ecología y evolución bacterianas<sup>8</sup>. Un ejemplo clave de la importancia de los plásmidos en la evolución bacteriana es su papel central en la diseminación de los mecanismos de RAM entre bacterias patógenas clínicas en las últimas décadas<sup>18</sup>. Algunos de los genes de RAM más relevantes desde el punto de vista clínico, como los que codifican carbapenemasas (enzimas  $\beta$ -lactamasas capaces de degradar los antibióticos carbapenem) se encuentran codificados en plásmidos conjugativos capaces de diseminarse entre clones de alto riesgo<sup>107,178</sup>.

Sin embargo, a pesar de la abundancia de plásmidos en las poblaciones bacterianas y de las ventajas potenciales asociadas a su adquisición, estos elementos genéticos suelen producir alteraciones fisiológicas en sus hospedadores bacterianos que conducen a una reducción de su capacidad competitiva, definida como coste de *fitness*<sup>31–33</sup> (ver apartado [Coste de fitness asociado a los plásmidos](#) en Introducción), lo que hace difícil explicar la persistencia de los plásmidos, a largo plazo, en las poblaciones bacterianas en ausencia de selección para los rasgos codificados por ellos. Este enigma es conocido como “la paradoja de los plásmidos”<sup>9</sup> (ver apartado [La paradoja de los plásmidos](#) en Introducción). Se han propuesto diferentes soluciones a esta paradoja. Por ejemplo, la evolución compensatoria contribuye a la persistencia de los plásmidos al aliviar los costes asociados a la presencia de los plásmidos; y una alta tasa de conjugación puede promover el mantenimiento de los plásmidos como parásitos genéticos en las poblaciones bacterianas<sup>74,76,77,79,80,179</sup>.

Por otro lado, la distribución de los plásmidos a través de sus hospedadores naturales no es producto del azar. Ciertas asociaciones entre plásmidos de RAM y clones de riesgo clínico resultan especialmente exitosas, dando lugar a “superbacterias” capaces de diseminarse incontrolablemente en entornos clínicos. Ejemplos de este fenómeno son *E. coli* ST131 y plásmidos IncF codificantes de CTX-M-15<sup>118,120</sup>; o *K. pneumoniae* ST11 o ST307 y el plásmido pOXA-48<sup>128,129</sup> (ver apartado [Enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas](#) en Introducción).

A pesar de que, en las últimas décadas, muchos estudios han investigado las condiciones de permanencia y distribución de los plásmidos en las poblaciones bacterianas<sup>68,71,74,77</sup>, la comprensión de la biología de las poblaciones de plásmidos se ve frenada por las limitaciones de los sistemas modelo utilizados para su estudio. En primer lugar, salvo notables

excepciones<sup>76,78,84</sup>, la mayoría de los trabajos experimentales sobre los costes de *fitness* han estudiado las asociaciones entre plásmidos y cepas bacterianas de diferentes orígenes ecológicos<sup>33,62,74,79–81,85,145</sup>. Estos ejemplos no reproducen necesariamente los efectos de *fitness* de los plásmidos en hospedadores bacterianos naturales, que permanecen en gran medida inexplorados. En segundo lugar, los estudios tienden a analizar los efectos de *fitness* de un solo plásmido en una sola bacteria. Sin embargo, los efectos de *fitness* de los plásmidos pueden diferir entre las bacterias<sup>81–83,85,86</sup>, y esta variabilidad puede afectar a la persistencia y distribución de los plásmidos en las comunidades bacterianas<sup>87</sup>, a menudo complejas, en las que un plásmido conjugativo puede propagarse entre diferentes hospedadores bacterianos produciendo distintos efectos de *fitness* en cada uno de ellos, lo que impactaría de forma efectiva en la persistencia del plásmido en la población, así como en su distribución a través de los distintos integrantes de la comunidad.

En el primer capítulo de esta tesis doctoral se proporciona una caracterización detallada de la distribución de los efectos de *fitness* de un plásmido de RAM en sus hospedadores naturales. Para ello, se utiliza un modelo experimental basado en el plásmido conjugativo de relevancia clínica, pOXA-48, que codifica la carbapenemasa *bla*<sub>OXA-48</sub> (ver apartado [Los plásmidos de tipo pOXA-48](#) en Introducción), y una colección de 50 cepas de enterobacterias aisladas de la microbiota intestinal de pacientes ingresados en un hospital terciario de Madrid.

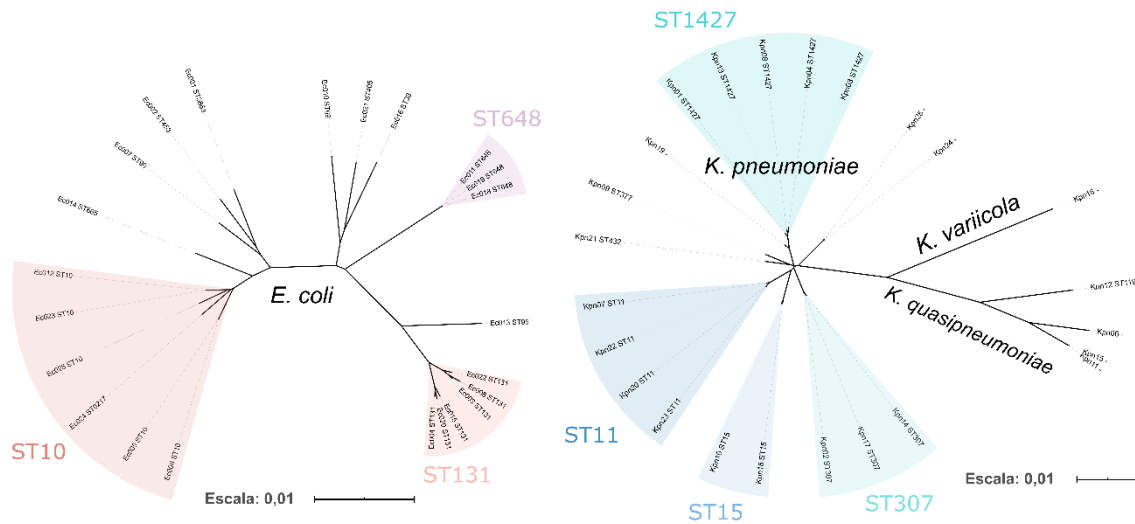
### *Construcción de una colección de enterobacterias transconjugantes portadoras del plásmido pOXA-48\_K8.*

. Se seleccionaron 50 aislados de la colección de R-GNOSIS, no portadores de carbapenemasas, como hospedadores bacterianos. La selección se realizó de acuerdo con los siguientes criterios: i) pertenecer a las dos especies portadoras de pOXA-48 más frecuentes, *K. pneumoniae* y *E. coli*; ii) haber sido aislados de pacientes localizados en guardias donde se reportase habitualmente la presencia de enterobacterias portadoras de pOXA-48<sup>136</sup>; y iii) haber sido aislados de pacientes sin historial de colonización previo por enterobacterias portadoras de pOXA-48, con el fin de evitar la selección de clones que hubieran podido experimentar adaptación a pOXA-48. La lógica subyacente para seleccionar los clones fue que careciesen de exposición previa al plásmido pOXA-48 pero que, a la vez, fuesen ecológicamente compatibles con él (es decir, aislados de pacientes que coincidieron en guardias con otros que si fueron colonizados por clones portadores de pOXA-48). Se seleccionaron 25 aislados de *K. pneumoniae* y 25 de *E.coli*, representativos de la variabilidad filogenética de la colección de R-GNOSIS (ver [Cepas, plásmido pOXA-48 K8 y condiciones de cultivo](#) en Material y Métodos, Tabla 1; Figura 12). Es importante destacar que debido a la naturaleza de la colección de R-GNOSIS, los aislados utilizados en este estudio producen BLEE. Las enterobacterias productoras de BLEE están extendidas no solo en hospitales sino también en la comunidad<sup>180</sup>, y la mayoría de las enterobacterias portadoras de pOXA-48 aisladas en hospitales también producen BLEE<sup>137</sup>.

Se introdujo pOXA-48\_K8 en la colección de cepas receptoras por conjugación (ver [Construcción de la colección de transconjugantes](#) en Material y métodos, Figura 7), y la presencia del plásmido fue confirmada a través de PCR y de pruebas de susceptibilidad antibiótica (Materiales y métodos, Tabla 2). La presencia de pOXA-48\_K8 se confirmó secuenciando el genoma completo de los 50 clones transconjugantes, lo que además reveló el parentesco genético de los aislados (Figura 8). En línea con lo sucedido en estudios previos<sup>136,181</sup>, los resultados de secuenciación revelaron que un pequeño conjunto de aislados identificados inicialmente como *K. pneumoniae* pertenecen, de hecho, a las especies *Klebsiella quasipneumoniae* (n=4) y *Klebsiella variicola* (n=1). Estas especies son también hospedadoras de plásmidos de tipo pOXA-48 en el hospital<sup>136,148</sup>, por lo que fueron mantenidas en este estudio (Figura 12).

### *Determinación de los efectos de fitness asociados a la presencia de pOXA-48\_K8.*

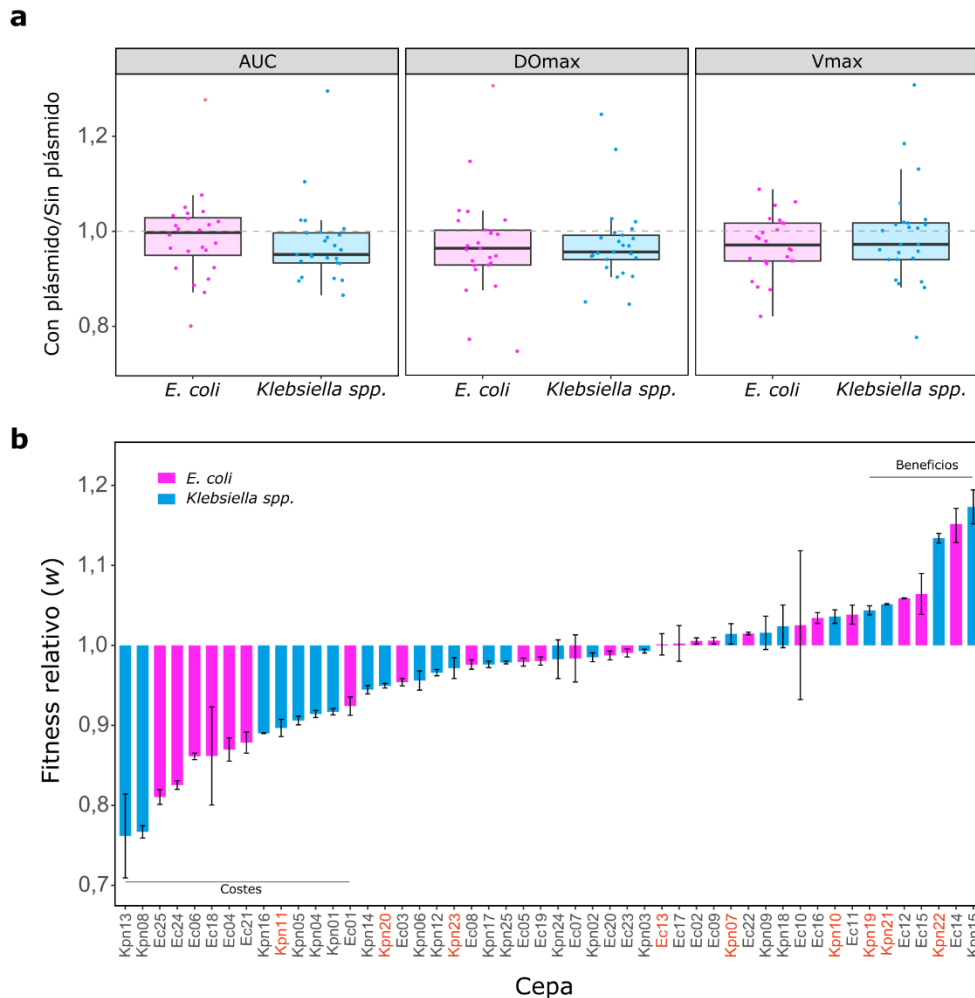
Para medir los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8, se llevaron a cabo curvas de crecimiento y ensayos de competición para todos los clones, portadores o no del plásmido. En primer lugar, se realizaron curvas de crecimiento en cultivos puros, para calcular la  $\mu_{max}$  y la  $DO_{max}$ . También se midió el AUC, que integra la información de los dos parámetros anteriores. Para estimar los efectos de *fitness* asociados al plásmido, comparamos dichos parámetros entre cada cepa portadora del plásmido y su ancestro isogénico sin él (Figura 13a).



**Figura 12. Representación filogenética de las cepas de enterobacterias usadas en este estudio.** Filogenia no enraizada de los genomas completos de los clones de *E. coli* (izquierda) y *Klebsiella spp.* (derecha) utilizados en este estudio. La longitud de las ramas da la distancia entre los grupos (medida de similitud k-mer). La agrupación de ST se indica también (*E. coli* ST6217 pertenece al grupo ST10). Nótese que los resultados de secuenciación revelaron que un pequeño grupo de aislados inicialmente identificados como *K. pneumoniae* resultaron ser *K. quasipneumoniae* (n=4) y *K. variicola* (n=1).

Los resultados muestran que pOXA-48\_K8 produce una disminución moderada de los parámetros extraídos de las curvas de crecimiento, lo que es más evidente en los aislados de *Klebsiella spp.* (Figura 13a, prueba de rangos de Wilcoxon pareado: *E. coli*, AUC,  $V=114$ ,  $P=0,20$ ;  $OD_{max}$ ,  $V=76$ ,  $P=0,020$ ;  $\mu_{max}$ ,  $V=186$ ,  $P=0,54$ ; *Klebsiella spp.*, AUC,  $V=54$ ,  $P=0,003$ ;  $OD_{max}$ ,  $V=44$ ,  $P=0,001$ ;  $\mu_{max}$ ,  $V=119$ ,  $P=0,25$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias entre la distribución de los parámetros de crecimiento relativos para los clones de *E. coli* y *Klebsiella spp.* portadores de pOXA-48\_K8 (prueba de suma de rangos de Wilcoxon: AUC,  $W=345$ ,  $P=0,38$ ;  $OD_{max}$ ,  $W=335$ ,  $P=0,50$ ;  $\mu_{max}$ ,  $W=347$ ,  $P=0,36$ ).

Los ensayos de competición permiten medir el *fitness* relativo ( $w$ ) de dos bacterias compitiendo por los recursos en el mismo cultivo<sup>148</sup>. La competición entre clones isogénicos portadores y no portadores del plásmido proporciona una evaluación cuantitativa de los costes en *fitness* asociados a la presencia de dicho plásmido. Para los ensayos de competición se usó citometría de flujo; las cepas fueron marcadas con fluorescencia usando el plásmido pBGC, un plásmido pequeño, no movilizable y que codifica para una proteína verde fluorescente inducible (ver [Construcción del plásmido pBGC](#) en Materiales y métodos). pBGC fue introducido por electroporación y todos los clones, con y sin pOXA-48\_K8 se compitieron contra su versión isogénica portadora de pBGC. No fue posible introducir pBGC en 9 aislados, por lo que, en estos casos, las versiones isogénicas con y sin pOXA-48\_K8 de cada uno de ellos se compitieron contra un competidor común, *E. coli* J53 con pBGC (ver [Ensayos de competición mediante citometría de flujo](#) en Material y métodos).

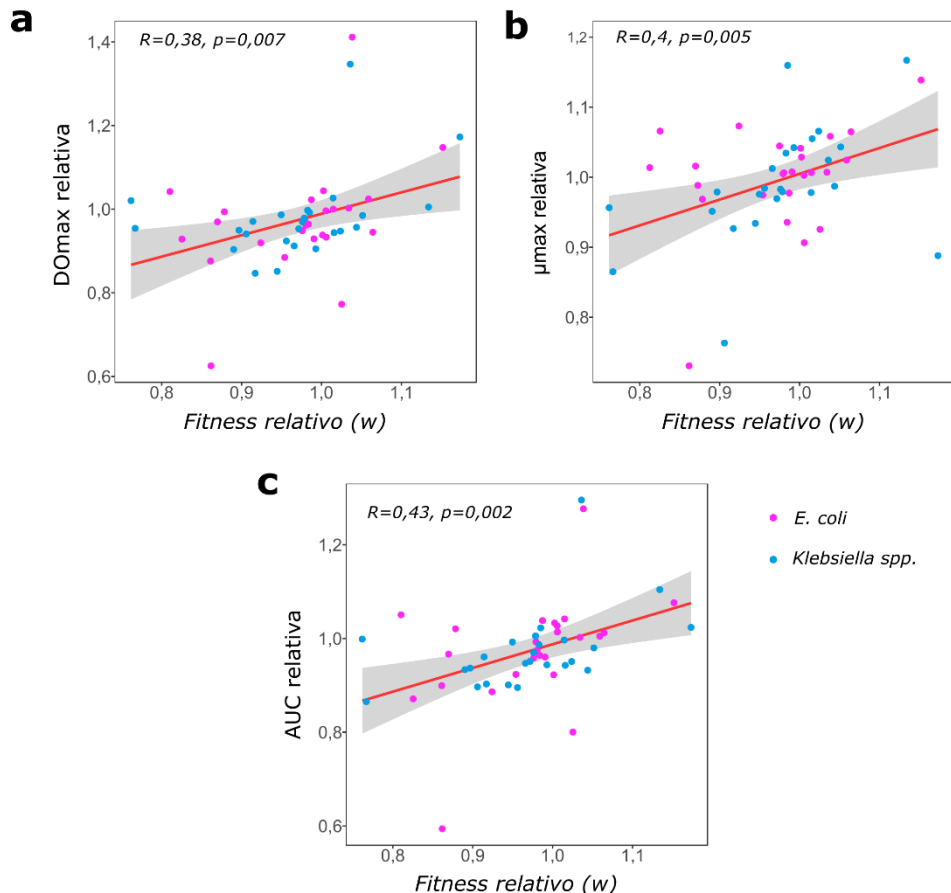


**Figura 13. Efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 en una colección de enterobacterias silvestres ecológicamente compatibles con el plásmido.** a) Valores relativos de los parámetros de las curvas de crecimiento (cepa con plásmido/ancestro sin plásmido): el área bajo la curva (AUC), la densidad óptica máxima ( $DO_{max}$ ), y la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), de los aislados de *E. coli* (rosa) y *Klebsiella spp.* (azul) se representan como diagramas de cajas y bigotes. Las líneas horizontales dentro de las cajas indican la mediana de los valores, las regiones superior e inferior de las cajas corresponden a los percentiles 25 y 75, y los bigotes se extienden a las observaciones dentro de 1,5 veces el rango del intercuartil. Los puntos representan cada valor relativo. Los valores <1 indican una reducción de esos parámetros asociada con la adquisición del plásmido. Se realizaron cuatro y seis réplicas biológicas de las curvas de crecimiento para los aislados silvestres y los transconjugantes, respectivamente. b) *Fitness* relativo ( $w$ ) de los clones portadores del plásmido en comparación con los clones sin plásmido obtenidos mediante ensayos de competición (rosa, *E. coli*; azul, *Klebsiella spp.*). Los valores <1 indican una reducción en  $w$  debida a la adquisición del plásmido; los valores >1 indican un incremento en el  $w$ . Las barras representan los valores de *fitness* relativo, normalizados por el efecto de pBGC (media de las cinco réplicas biológicas independientes de la competición de cepas portadoras de pOXA-48\_K8 frente a cepas portadoras de pBGC, dividido por el resultado medio las cinco réplicas biológicas independientes de la competición de las cepas ancestrales sin pOXA-48\_K8 frente a las cepas portadoras de pBGC) y las barras de error representan el error estándar propagado. Dos líneas horizontales señalan a aquellos clones que mostraron costes o beneficios significativos asociados con la presencia de pOXA-48\_K8 ( $t$  test de dos muestras corregido por Bonferroni,  $P < 0.05$ ). Los nombres de los clones para los que el *fitness* relativo fue calculado usando *E. coli* J53/pBGC, están indicadas en rojo.

Los datos de los ensayos de competición fueron usados para calcular el *fitness* de los clones portadores pOXA-48\_K8 con relación a sus ancestros no portadores del plásmido (Figura 13b). No se observaron diferencias significativas entre los efectos de *fitness* producidos por pOXA-48\_K8 en los aislados de *Klebsiella spp.* y en *E. coli* (ANOVA de la interacción de la especie x el plásmido:

$F=0,088$ ,  $df=1$ ,  $P=0,767$ , test de normalidad de Shapiro–Wilk para los valores de  $w$ . *Klebsiella spp.*,  $P=0,21$ ; *E. coli*,  $P=0,15$ ).

Para validar estos resultados, se compararon los valores obtenidos de las curvas de crecimiento con los obtenidos en las competencias (Figura 14). Este análisis revela que existe una discreta pero significativa correlación entre los valores de *fitness* relativo y los parámetros extraídos de las curvas de crecimiento (correlación de Pearson: AUC,  $R=0,4$ ,  $P=0,005$ ;  $OD_{max}$ ,  $R=0,33$ ,  $P=0,021$ ;  $\mu_{max}$ ,  $R=0,4$ ,  $P=0,004$ , Figura 10).

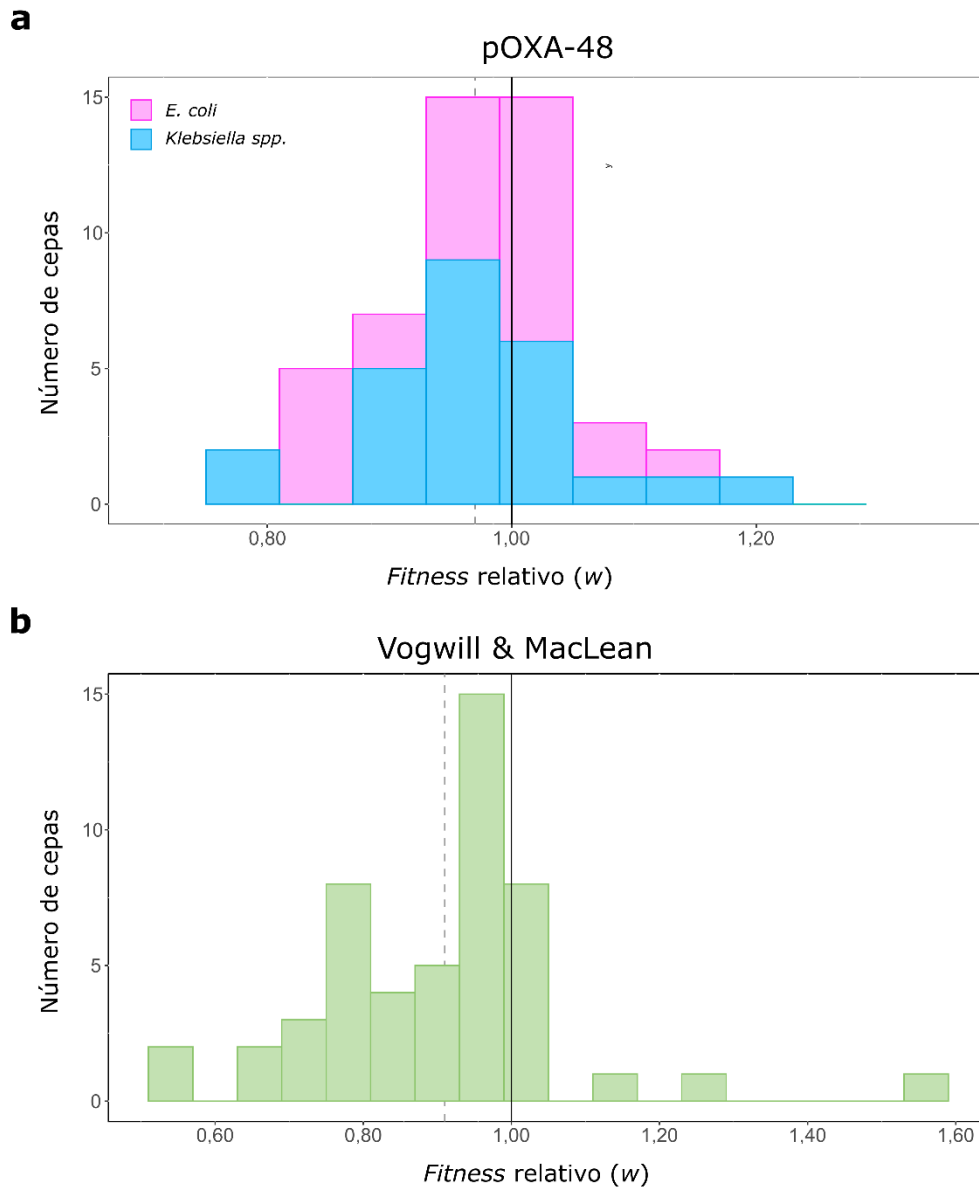


**Figura 14. Correlación entre los valores relativos de los parámetros de las curvas de crecimiento y el *fitness* relativo.** Correlación entre los valores relativos de **a** densidad óptica máxima ( $DO_{max}$ ), **b** tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), y **c** área bajo la curva (AUC), y los valores de *fitness* relativos obtenidos en ensayos de competición para cada cepa del estudio. La línea roja representa el modelo de regresión lineal y el sombreado gris representa el intervalo de confianza del 95%. Los puntos representan cada valor relativo (rosa, *E.coli* y azul, *Klebsiella spp.*). El coeficiente de correlación de Pearson  $R$  y el  $p$ -valor se indican en el lateral de cada recuadro.

#### Distribución de los efectos de *fitness* asociados a la presencia del plásmido *pOXA-48*

Los resultados de los ensayos de competición mostraron que el efecto general de *pOXA-48\_K8* fue una pequeña, pero significativa, reducción del *fitness* relativo ( $w$  media = 0,971, ANOVA del efecto del plásmido;  $F=70,04$ ,  $df=1$ ,  $P=1,02 \times 10^{-15}$ ). Sin embargo, los efectos de *fitness* del plásmido variaron enormemente entre los aislados de la población, dando lugar a una distribución normal que va desde una reducción >20% hasta un aumento de casi un 20% del *fitness* relativo (Figuras 14b y 15a; test de normalidad de Shapiro–Wilk,  $P=0,14$ ).

De hecho, la adquisición del plásmido está asociada a una reducción significativa del *fitness* en solo 14 aislados, y 7 aislados muestran un aumento significativo del *fitness* (*t* test de dos muestras corregida por Bonferroni,  $P < 0,05$ ). Estos resultados revelaron un escenario muy dinámico en el cual el plásmido produce una amplia distribución de efectos de *fitness* en los diferentes hospedadores bacterianos, que va desde costes hasta beneficios.

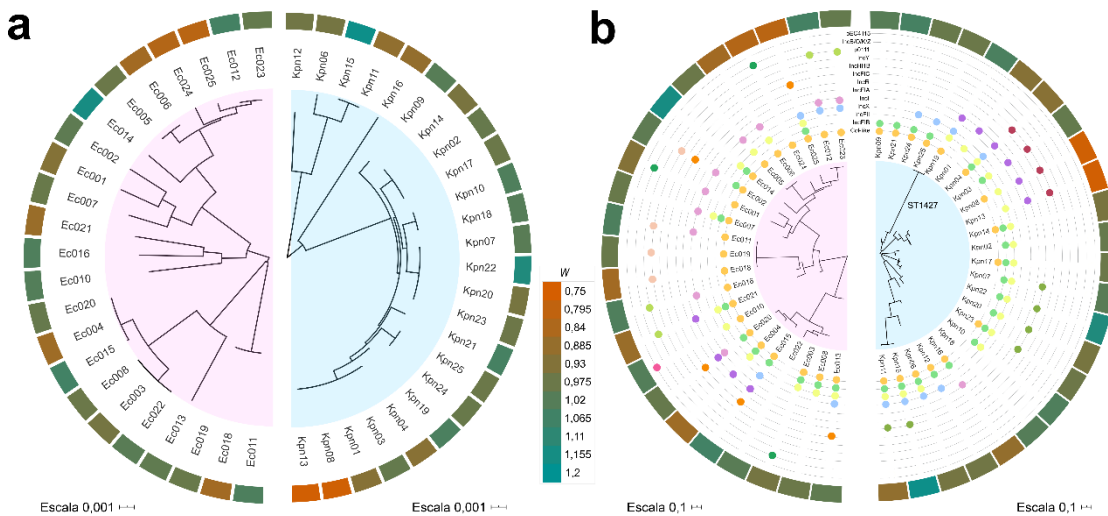


**Figura 15. Distribución de los efectos de *fitness* del plásmido.** Comparación entre los efectos de *fitness* obtenidos en este estudio y los obtenidos en estudios previos. **a** Distribución de los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 en la colección de enterobacterias ecológicamente compatibles. Las barras indican el número de cepas de *E. coli* (rosa) y *Klebsiella spp.* (azul) en cada categoría de *fitness* relativo (*w*). La línea de puntos gris indica la media del *w* de la población. Nótese que los valores de *w* siguen una distribución normal ( $w = 0,971$ ,  $\text{var} = 0,0072$ , prueba de normalidad de Shapiro-Wilk,  $P = 0,14$ ). **b** Distribución de los efectos de *fitness* de distintos plásmidos en distintos hospedadores bacterianos obtenidos en un metaanálisis previo<sup>177</sup>. La mayoría de los estudios incluidos se realizaron con plásmidos y bacterias de diferentes orígenes ecológicos. Las barras indican el número de asociaciones plásmido-bacteria en cada categoría de *fitness* relativo. La línea de puntos gris indica la media del *w* de todos los estudios. Los valores de *w* no están normalmente distribuidos ( $w = 0,91$ ,  $\text{var} = 0,029$ ; prueba de normalidad de Shapiro-Wilks,  $P = 0,0006$ ).

Para poner estos resultados en contexto con los estudios anteriores, se comparó la distribución de efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 con los resultados de un metaanálisis reciente de los efectos de *fitness* de los plásmidos de Vogwill y MacLean<sup>177</sup> (Figura 15b). Estos autores recogieron datos de parejas de 50 plásmidos y bacterias, de diferentes orígenes, obtenidos en 16 estudios distintos. Los efectos de *fitness* obtenidos en dichos estudios mostraron un mayor coste medio del plásmido ( $w$  medio = 0,91) que diferían significativamente de la distribución de efectos de *fitness* que se reporta aquí para pOXA-48\_K8 en enterobacterias silvestres (prueba de rangos de Wilcoxon,  $V = 922$ ,  $P = 0,006$ ).

*Distribución de los efectos de fitness asociados a pOXA-48 a través de la filogenia de los hospedadores bacterianos.*

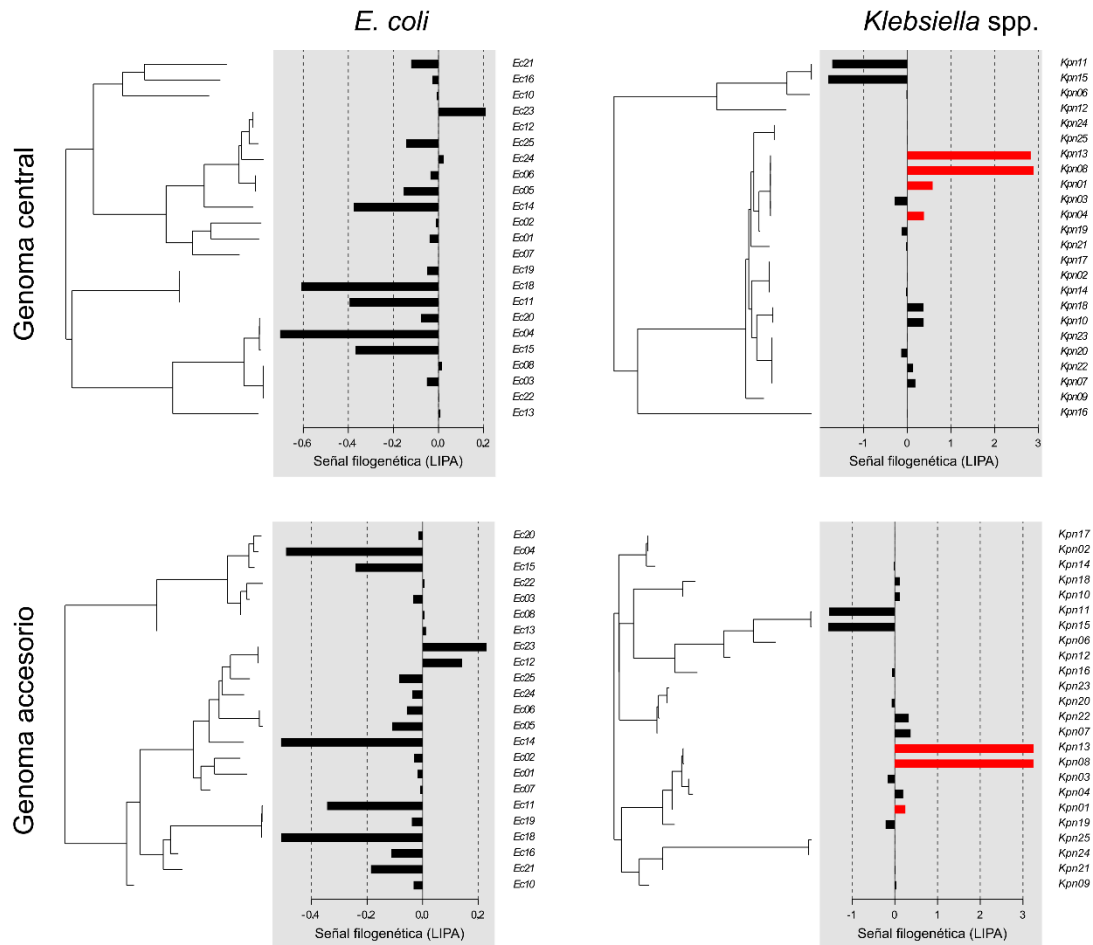
Se analizó la distribución de los efectos de *fitness* a través de la filogenia de nuestros aislados, con el objetivo de determinar si el contenido genético puede ayudar a predecir los efectos de *fitness* de un plásmido en una determinada bacteria (Figura 16). Se calculó el parentesco genético de los aislados de *Klebsiella spp.* y *E.coli* mediante la comparación de su genoma core (Figura 16a). Los efectos de *fitness* del plásmido pueden estar fuertemente influenciados también por el genoma accesorio. Por ejemplo, la presencia de otros elementos móviles puede impactar profundamente en el coste en *fitness* de un plásmido<sup>50,62</sup>, por lo que también se construyeron árboles partir de la matriz de distancia de la red de genes accesorios<sup>160</sup>, que incluye el contenido de plásmidos (Figura 16b).



**Figura 16. Efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 a través del contenido del genoma bacteriano.** Se detectó una asociación entre el efecto en *fitness* de pOXA-48\_K8 y el contenido genómico del hospedador bacteriano para cuatro aislados de *K. pneumoniae* ST1427. **a** Relación con el genoma central de los aislados de *E. coli* (izquierda) y de *Klebsiella spp.* (derecha). La construcción del árbol está basada en polimorfismos en el genoma core. El círculo exterior indica el *fitness* relativo de los clones portadores de pOXA-48\_K8 (código de colores en la leyenda; rojo indica coste en *fitness* y azul indica beneficios asociados con la adquisición de pOXA-48\_K8). Los asteriscos indican clones con una señal filogenética asociada a efectos de *fitness* del plásmido (LIPA,  $P < 0,05$ ). **b** Relación con el genoma accesorio de los aislados de *E. coli* (izquierda) y *Klebsiella spp.* (derecha). Este árbol es un árbol del contenido genético construido a partir de la matriz de distancia de los genes accesorios de cada grupo. El círculo externo indica el *fitness* relativo como en **a**. Los círculos intermedios indican la presencia/ausencia de plásmidos pertenecientes a las diferentes familias de plásmidos nombradas en la figura. Obsérvese que sólo dos aislados no portan ningún plásmido. Los asteriscos denotan clones con una señal filogenética significativa que asocia la composición del genoma accesorio con los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 (LIPA,  $P < 0,05$ ).

Para cada grupo de aislados, se analizaron los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 a través de los genomas central y accesorio usando el indicador local del índice de asociación filogenética (*Local Indicator of Phylogenetic Association index*, LIPA) (Figura 17). Para los aislados de *E. coli* los resultados muestran que no existe asociación entre los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 con las filogenias procedentes de los genomas central y accesorio (LIPA,  $P > 0.1$ ). Por el contrario, para *Klebsiella spp.* los índices LIPA revelan una señal filogenética significativa en cuatro clones, en los cuales pOXA-48\_K8 produce un gran coste en *fitness*, todos ellos procedentes del ST1427 (Kpn01, Kpn04, Kpn08 y Kpn13, cuatro de los cinco clones del ST1427 analizados en este estudio; LIPA,  $P < 0,05$ ). Tres de estos clones ST1427 también producen una señal significativa en el análisis de los efectos de *fitness* a través del genoma accesorio (Kpn01, Kpn08 y Kpn13; LIPA,  $P < 0,05$ ). Por lo tanto, se analizó la asociación específica entre el contenido plasmídico de cada clon nativo con los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 en *Klebsiella spp.* Este análisis reveló que la presencia de plásmidos pertenecientes a las familias IncFIA o IncH1B, así como la ausencia de plásmidos de la familia IncFIB, estaban estrechamente asociadas con costes en *fitness* elevados. Sin embargo, dado que esos perfiles plasmídicos específicos están estrechamente asociados a clones ST1427 en nuestra colección, es difícil desentrañar la contribución relativa del contenido del genoma core, del genoma accesorio o del contenido plasmídico a la hora de determinar los costes en *fitness* de pOXA-48\_K8 en este ST.

Los resultados revelaron que pOXA-48\_K8 tendía a producir un elevado coste en los clones de *K. pneumoniae* ST1427. Y cabe destacar que, aunque *K. pneumoniae* ST1427 es relativamente común en nuestro hospital (constituye el 4.8% de las *K. pneumoniae* productoras de BLEE<sup>142</sup>), ninguno de los 103 aislados de *K. pneumoniae* portadores de pOXA-48 recogidos en la colección R-GNOSIS provienen de este ST<sup>136</sup> (prueba exacta de Fisher para recuento de datos, 8/166 frente a 0/103,  $P = 0,025$ ). Estos resultados sugieren que el elevado coste asociado con la adquisición del plásmido en este clado podría limitar la transmisión hospitalaria de *K. pneumoniae* ST1427 portadora de pOXA-48. Por el contrario, los plásmidos de tipo pOXA-48 están comúnmente asociados a *K. pneumoniae* ST11 en nuestro hospital<sup>136,137</sup>, y en los cuatro clones ST11 estudiados en este trabajo, pOXA-48\_K8 produce efectos de *fitness* no significativos (Kpn07, Kpn20 y Kpn23, Figura 13b) o incluso beneficiosos (Kpn22, Figura 13b; efectos de *fitness* en ST1427 [ $n = 5$ ] frente a en ST11 [ $n = 4$ ], *t* test de dos colas de varianzas desiguales de Welch,  $t = -2,39$ ,  $df = 7$ ,  $P = 0,048$ ).



**Figura 17. Análisis del Indicador Local de Asociación Filogenética (LIPA).** Árboles filogenéticos para los genomas core (paneles superiores) y accesorio (paneles inferiores) obtenidos para *E. coli* (izquierda) y *Klebsiella* spp. (derecha). Los gráficos de barras muestran la puntuación LIPA asociada a cada punta de la filogenia, con valores más altos que representan una señal filogenética más fuerte. El color rojo indica puntuaciones LIPA estadísticamente significativas.

### *Modelización del impacto de la variabilidad de los efectos de fitness en la estabilidad de los plásmidos.*

En general, los modelos matemáticos aplicados a la biología de poblaciones de plásmidos han considerado una población clonal en la cual un plásmido produce una reducción constante de la tasa de crecimiento<sup>68,69,71,74,77,182,183</sup>. Estos modelos habitualmente incluyen una tasa de pérdida del plásmido por segregación<sup>184,185</sup> y una tasa de transmisión horizontal del plásmido por conjugación<sup>68,69,186</sup>. Además, algunos de ellos incorporan también una tasa de aparición de mutaciones compensatorias capaces de aliviar los costes de *fitness* asociados a la presencia del plásmido a lo largo del tiempo<sup>74,183</sup>. Los resultados de esta tesis doctoral muestran que el plásmido pOXA-48\_K8 produce efectos de *fitness* variables en hospedadores bacterianos naturales ecológicamente compatibles con él. Esta variabilidad podría tener una importante influencia en la estabilidad del plásmido en comunidades naturales policlonales. Para evaluar el efecto de la variabilidad de efectos de *fitness* en la estabilidad de los plásmidos en las comunidades bacterianas, se desarrolló un modelo matemático simple basado en el trabajo pionero de Stewart y Levin sobre

las condiciones de existencia de los plásmidos<sup>69</sup>. El objetivo específico fue implementar este modelo matemático simple con la distribución de efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 determinada experimentalmente, para explorar las consecuencias de la variabilidad de efectos de *fitness* en el mantenimiento de los plásmidos en comunidades bacterianas policlonales, tal y como ocurre en las microbiotas naturales.

El modelo describe la dinámica de poblaciones de múltiples subpoblaciones compitiendo por un único recurso agotable en las mismas condiciones ambientales, asumiendo que la transición ente células con plásmido y células sin plásmido se realiza a través de eventos de pérdida por segregación. La tasa de crecimiento de cada población está determinada por un término de Monod sustrato dependiente que depende de la concentración extracelular de recursos, y por ello, cada cepa se puede describir con dos parámetros estructuralmente identificables<sup>53</sup>: la tasa de conversión de recursos ( $\rho$ ) y la afinidad específica por un recurso ( $V_{\max}/K_m$ ). Estos parámetros fueron estimados a partir de las curvas de crecimiento de cada aislado cultivado en monocultivo (con y sin el plásmido) usando un MCMC Metropolis-Hastings<sup>166</sup>.

Resolviendo el sistema de ecuaciones diferenciales (Ecuaciones 2-4, descrito en Métodos), se pudo evaluar la frecuencia final de células portadoras de plásmidos en un experimento de competición *in silico* con una duración de  $T$  unidades de tiempo para cuantificar los efectos de *fitness* del plásmido en cada cepa. La figura 18b muestra los valores de *fitness* relativos obtenidos tras realizar competiciones computacionales por parejas entre las subpoblaciones portadora y libre del plásmido, lo que resulta en una distribución de efectos de *fitness* teórica ( $w = 0,985$ ,  $\text{var} = 0,007$ ) consistente con la determinada experimentalmente (Figura 15a,  $w = 0,971$ ,  $\text{var} 0,0072$ ).

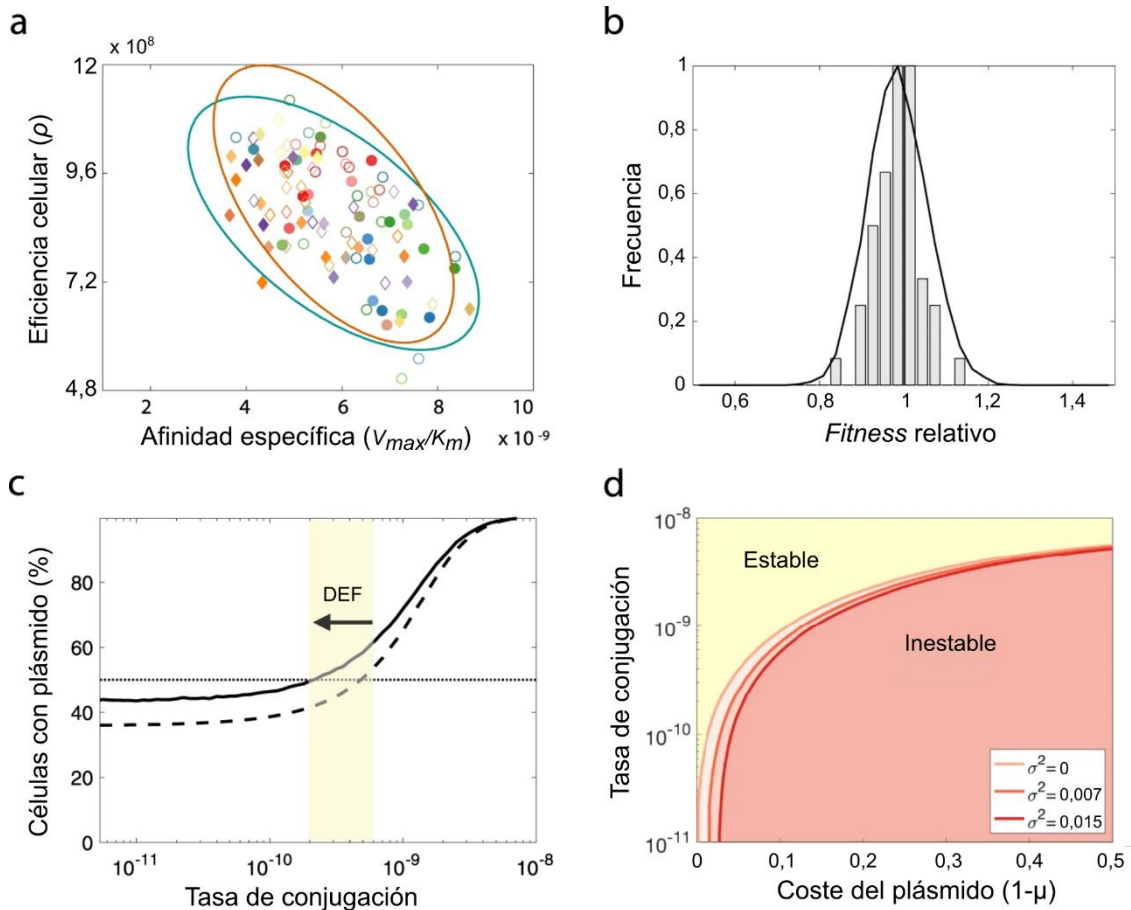
Estudios previos han mostrado que la probabilidad de fijación de un plásmido en una población bacteriana es directamente proporcional a la tasa de conjugación del plásmido<sup>68,69,184</sup>. Como en estos estudios previos, en esta tesis se consideró la transmisión horizontal de los plásmidos en función de las densidades de células donadoras y receptoras, con eventos de conjugación que ocurren con una frecuencia constante. Las competiciones entre los clones portadores y libres del plásmido para un determinado rango de tasas de conjugación se ilustran en la Figura 18c. Mientras que con tasas de conjugación bajas los clones libres del plásmido superan a los clones portadores, con altas tasas de conjugación, aumenta la frecuencia de células portadoras del plásmido. No obstante, permitir que los efectos de *fitness* varíen, reduce el umbral de conjugación necesario para la persistencia del plásmido en la población en comparación con la hipótesis de asumir efectos de *fitness* fijos (Fig.18c). El efecto de la variabilidad de los efectos de *fitness* en la estabilidad de los plásmidos es particularmente relevante en el caso de aquellos plásmidos que producen un coste medio bajo (como pOXA-48\_K8), ya que la disponibilidad de hospedadores donde el plásmido produce un coste moderado o incluso beneficioso es relativamente alta. Sin embargo, en los plásmidos que producen un gran coste de *fitness* medio, el umbral de conjugación requerido para el

mantenimiento del plásmido en la población se ve menos afectado por la variabilidad de efectos de *fitness* en los diferentes hospedadores bacterianos (Figura 18d).

*La complejidad de las comunidades bacterianas favorece la persistencia de los plásmidos.*

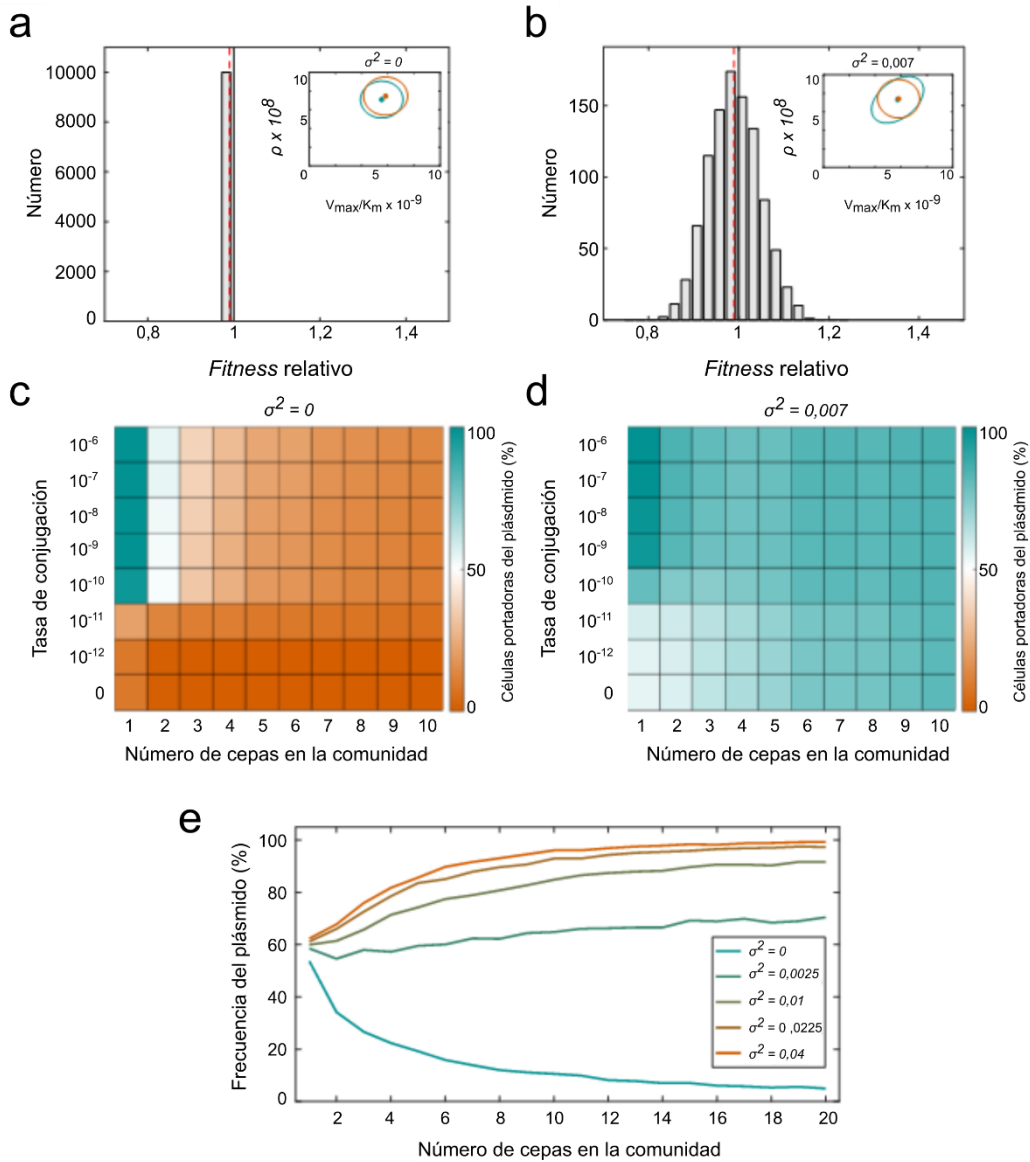
Los resultados de esta tesis doctoral sugieren que la complejidad de la comunidad podría promover la persistencia de los plásmidos dando acceso a los mismos a subpoblaciones de hospedadores más permisivos. Con el objetivo de explorar cómo se ve afectada la estabilidad de los plásmidos en las comunidades bacterianas al incrementar la complejidad de estas comunidades y las tasas de transmisión horizontal del plásmido, se muestrearon al azar  $N = 104$  células libres de plásmidos de la distribución de los parámetros de crecimiento estimados mediante el algoritmo MCMC. Estas comunidades aleatorias se usaron para estudiar las dinámicas de población de plásmidos que se transmiten vertical y horizontalmente en comunidades compuestas por múltiples cepas bacterianas. El coste de *fitness* (o el beneficio) de portar plásmidos fue modelizado como una variable aleatoria que modifica la tasa de crecimiento de los clones silvestres (no portadores del plásmido) en un factor  $\sigma$ , de forma que, si  $\sigma = 0$ , la distribución de efectos de *fitness* no tiene varianza, es decir, asume un único valor de *fitness* relativo en todos los hospedadores (Figura 19a), pero si  $\sigma > 0$ , el resultado es una distribución de efectos de *fitness* simétrica con dos colas que se expanden a derecha e izquierda hacia efectos positivos y negativos de *fitness*, respectivamente (Figura 19b), lo que indica la existencia de hospedadores en los cuales el plásmido produciría efectos beneficiosos de *fitness*.

Para determinar cómo la variabilidad de efectos de *fitness* influencia la persistencia de los plásmidos en las comunidades polimicrobianas, se amplió el modelo para considerar poblaciones compuestas por subconjuntos de 1, 2, 3, 4, ...,  $M \leq N$  tipos celulares, muestreados al azar a partir de los parámetros de distribución silvestres (sin plásmido). Esto permitió estimar la frecuencia relativa de células portadoras del plásmido al final de un experimento a largo plazo y evaluar la estabilidad del plásmido en una comunidad policlonal con diferentes estructuras de población. Las densidades bacterianas iniciales se determinaron ejecutando primero el sistema durante  $T = 24$  unidades de tiempo (con todas las cepas inicialmente presentes en densidades iguales y portando pOXA-48), y a continuación, eliminando todas las células libres del plásmido de la población. Esta situación es similar a la de los pacientes que reciben una terapia antibiótica que elimina de la comunidad bacteriana a todas las células sin plásmidos portadores de resistencia para dicho antibiótico. En la Fig. 19 se muestran los resultados obtenidos tras 5.000 simulaciones por ordenador con distintas tasas de conjugación y distinto número de tipos celulares presentes en la comunidad. Estas simulaciones, o bien asumen idéntico coste de *fitness* para todas las cepas (Figura 19a, c;  $w = 0,985$ ,  $\text{var} = 0$ ); o bien permiten que los efectos de *fitness* varíen conforme a lo observado experimentalmente (Figura 19b, d;  $w = 0,985$ ,  $\text{var} = 0,007$ ).



**Figura 18. Modelización de los efectos de *fitness* de pOXA-48.** **a** Distribución de los valores de los parámetros obtenidos utilizando la inferencia bayesiana para estimar los parámetros cinéticos de crecimiento a partir de las mediciones de DO (curvas de crecimiento) obtenidas para cada aislado. Los rombos representan a los clones de *Klebsiella spp.* y los círculos representan los clones de *E. coli.*; los símbolos con relleno representan a los clones portadores de pOXA-48\_K8 y los símbolos vacíos representan a las células sin plásmido. Las elipses representan la desviación estándar de las distribuciones normales mejor ajustadas (en verde la de las células portadoras del plásmido y en naranja la de las células no portadoras del plásmido). **b** Las barras representan la distribución de los efectos de *fitness* del plásmido obtenidos de los ensayos de competición *in silico* con valores de parámetros determinados a partir de curvas de crecimiento experimentales. La curva continua representa la distribución estimada computacionalmente obtenida mediante el muestreo aleatorio de las distribuciones de los parámetros de clones silvestres y transconjugantes, obtenidos mediante el algoritmo MCMC y resolviendo numéricamente el modelo para evaluar la aptitud relativa asociada a la presencia de plásmidos. **c** Fracción de células portadoras del plásmido (tras competir con células libres del plásmido) en función de la tasa de transferencia horizontal para asociaciones aleatorias plásmido-hospedador muestreadas a partir de la distribución de parámetros MCMC. La línea de puntos representa la media de  $10^4$  ensayos de competición bajo el supuesto de que la presencia de los plásmidos está asociada con una reducción del *fitness* de los distintos hospedadores ( $w = 0,985$ ,  $\text{var} = 0$ ); la línea sólida se obtiene considerando un amplia variabilidad de efectos de *fitness* ( $w = 0,985$ ,  $\text{var} = 0,007$ ). La flecha denota la diferencia en el umbral de conjugación necesario para seleccionar positivamente los plásmidos en la población, lo que apoya el principio de que la variabilidad en los efectos de *fitness* mantiene los plásmidos en la población con tasas de conjugación más bajas. **d** Estabilidad de los plásmidos en función del coste del plásmido y de la tasa de conjugación. El área amarilla corresponde al rango de tasas de conjugación y costes de *fitness* que seleccionan positivamente al plásmido en la población; por el contrario, el área roja indica el rango en el cual el plásmido es inestable. Las líneas representan las tasas de conjugación críticas estimadas numéricamente tras realizar  $10^3$  experimentos de competición, asumiendo que la presencia del plásmido está asociada con diferentes niveles de variabilidad en los efectos de *fitness* (indicado en la leyenda). Cabe destacar que el incremento en la estabilidad del plásmido asociado con la variabilidad de efectos de *fitness* es más relevante en plásmidos que producen un coste de *fitness* media-bajo.

Aunque el coste de *fitness* medio es el mismo en ambas condiciones, los resultados de los experimentos computacionales sugieren que permitir que los efectos de *fitness* varíen entre los miembros de la comunidad aumenta notablemente las posibilidades de persistencia del plásmido, especialmente con tasas de conjugación bajas. Y lo que es más relevante, en las simulaciones numéricas, la frecuencia del plásmido disminuye con la complejidad de la comunidad cuando la adquisición del plásmido está asociada a un coste de *fitness* constante, pero aumenta con la complejidad de la comunidad cuando se asumen distribuciones de efectos de *fitness* con mayor varianza (Figura 19c-e). La explicación para este fenómeno es que, si el coste de *fitness* del plásmido es idéntico en todos los miembros de la comunidad, la diversidad significa, simplemente, una competencia adicional y la persistencia del plásmido se vuelve más dependiente de tasas de conjugación elevadas. Por el contrario, si los efectos de *fitness* varían, un mayor número de hospedadores bacterianos disponibles en la población aumentará la probabilidad de que el plásmido llegue a un hospedador en el cual no produzca coste de *fitness* o resulte, incluso, beneficioso. Este resultado es importante porque implica que el incremento de la complejidad de la comunidad bacteriana podría aumentar la persistencia de los plásmidos en el entorno natural. Dado que la mayoría de las microbiotas naturales son comunidades complejas en las cuales un plásmido puede conjugarse y replicarse en diferentes clones, estos resultados pueden ayudar a explicar la alta prevalencia de los plásmidos en la naturaleza. Estos resultados también indican que el umbral de conjugación necesario para la persistencia de un plásmido en una comunidad podría ser más bajo de lo que se pensaba previamente. De hecho, una vez que los plásmidos están presentes en múltiples miembros de una comunidad, pueden ser capaces de persistir incluso en ausencia de conjugación (Figura 19d).



**Figura 19. Persistencia de los plásmidos en comunidades complejas.** Modelización de la persistencia de los plásmidos en comunidades polimicrobianas, asumiendo efectos fijos (**a,c**) o variables (**b,d**) de *fitness* asociados al plásmido. **a,b.** Histograma de *fitness* relativo obtenido mediante el muestreo aleatorio de  $10^4$  valores de la distribución de parámetros mostrada en el gráfico del recuadro (los puntos ilustran valores esperados de cada distribución y las elipses su desviación estándar; verde, bacterias con plásmidos; naranja, bacterias sin plásmidos). La elipse verde en **b** es mayor como consecuencia de considerar que el coste de portar plásmidos se distribuye normalmente con varianza ( $\sigma^2 = 0.007$ ). Como resultado la distribución de los efectos en el *fitness* del plásmido también tiene una mayor varianza, con una fracción considerable de asociaciones plásmido-hospedador que producen un beneficio para el hospedador. Las líneas de puntos rojas indican el valor medio de *fitness* relativo. **c,d** el gradiente de color representa el porcentaje de células portadoras de plásmidos al final de 5000 simulaciones estocásticas; el naranja indica una población sin plásmidos y el verde una comunidad compuesta por células portadoras de plásmidos. Si el hecho de portar un plásmido está asociado a un coste en *fitness* fijo para todos los miembros de la comunidad, el mantenimiento de los plásmidos requiere una alta tasa de conjugación. El aumento de la proporción de células portadoras de plásmidos en **d** indica que una distribución de los efectos de *fitness* del plásmido con alta varianza reduce la tasa de conjugación crítica necesaria para mantener los plásmidos en la población, permitiendo que los plásmidos persistan con tasas de conjugación bajas. **e.** Fracción media de células portadoras de plásmidos en función del número de cepas en la comunidad con una tasa de conjugación  $\gamma = 1.5 \times 10^{-11}$ . Si el plásmido siempre produce una reducción del *fitness* en el hospedador (media  $w < 1$  y baja varianza), la frecuencia del plásmido disminuye a medida que aumenta el número de cepas de la comunidad (línea verde). Por el contrario, para una mayor varianza con el mismo valor medio de  $w$ , la fracción de células portadoras de plásmidos aumenta con la complejidad de la comunidad (línea naranja). Modificado de ref.<sup>187</sup>



## Capítulo 2. Análisis de las transmisiones vertical y horizontal de pOXA-48 en un conjunto de enterobacterias ecológicamente compatibles con el plásmido



Una de las principales características de los plásmidos es que son capaces de transmitirse tanto vertical como horizontalmente. La transmisión vertical está ligada a la división del hospedador bacteriano, y la transmisión horizontal está mediada principalmente por la conjugación<sup>188</sup>. La transmisión vertical de plásmidos se ve favorecida en presencia de una presión selectiva que selecciona los genes codificados por los plásmidos, pero en ausencia de selección, la transmisión vertical suele verse obstaculizada por los costes de *fitness* que los plásmidos producen en sus hospedadores bacterianos<sup>31,32</sup>. La transmisión horizontal de los plásmidos podría, en principio, compensar el déficit de transmisión vertical asociado a los costes de *fitness* de los plásmidos, aunque las tasas de conjugación son muy variables según el tipo de plásmido<sup>69,77</sup>. En consecuencia, la interacción entre los modos de transmisión horizontal y vertical (y su evolución) determina la distribución de los plásmidos en las poblaciones bacterianas<sup>43,189,190</sup>. Múltiples estudios teóricos y experimentales han investigado la dinámica de los plásmidos en poblaciones bacterianas clonales<sup>68,69,74,77,182,183,191</sup>. Sin embargo, hay muy pocas pruebas sobre cómo varía la dinámica de transmisión vertical/horizontal de los plásmidos en la diversidad de bacterias silvestres que los plásmidos encuentran en las comunidades naturales, y sobre cómo esta variabilidad puede afectar a la distribución de los plásmidos en las microbiotas naturales complejas<sup>78,87</sup>.

Un ejemplo dramático de la capacidad de los plásmidos para promover la evolución bacteriana es el papel central que han desarrollado en la propagación de la RAM en patógenos clínicos, que representa una de las amenazas más urgentes para la salud pública a las que se enfrenta la humanidad<sup>90,192</sup>. Un grupo especialmente preocupante de patógenos resistentes a los medicamentos es el de las enterobacterias productoras de carbapenemasas, que pertenecen a la lista de "patógenos prioritarios" de la OMS<sup>90,193</sup> (ver apartado [Enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas](#) en Introducción). Los plásmidos del tipo pOXA-48 son uno de los grupos de plásmidos productores de carbapenemasas más importantes desde el punto de vista clínico (ver apartado [Los plásmidos de tipo pOXA-48](#) en Introducción)<sup>135</sup>. Sin embargo, pOXA-48, al igual que la mayoría de los plásmidos de RAM, no se distribuye al azar entre los huéspedes bacterianos. Aunque pOXA-48 es capaz de replicar en multitud de especies distintas del orden *Enterobacterales*, este plásmido está fuertemente asociado a *K. pneumoniae*, siendo particularmente prevalente en ciertos clones de alto riesgo de los secuenciotipos ST11, ST405 o ST307<sup>136,178</sup>. En el primer capítulo de esta tesis doctoral se demuestra que este sesgo en la distribución no puede ser explicado únicamente por los costes de *fitness* que pOXA-48 produce en los diferentes hospedadores bacterianos, sobre todo a nivel de especie.

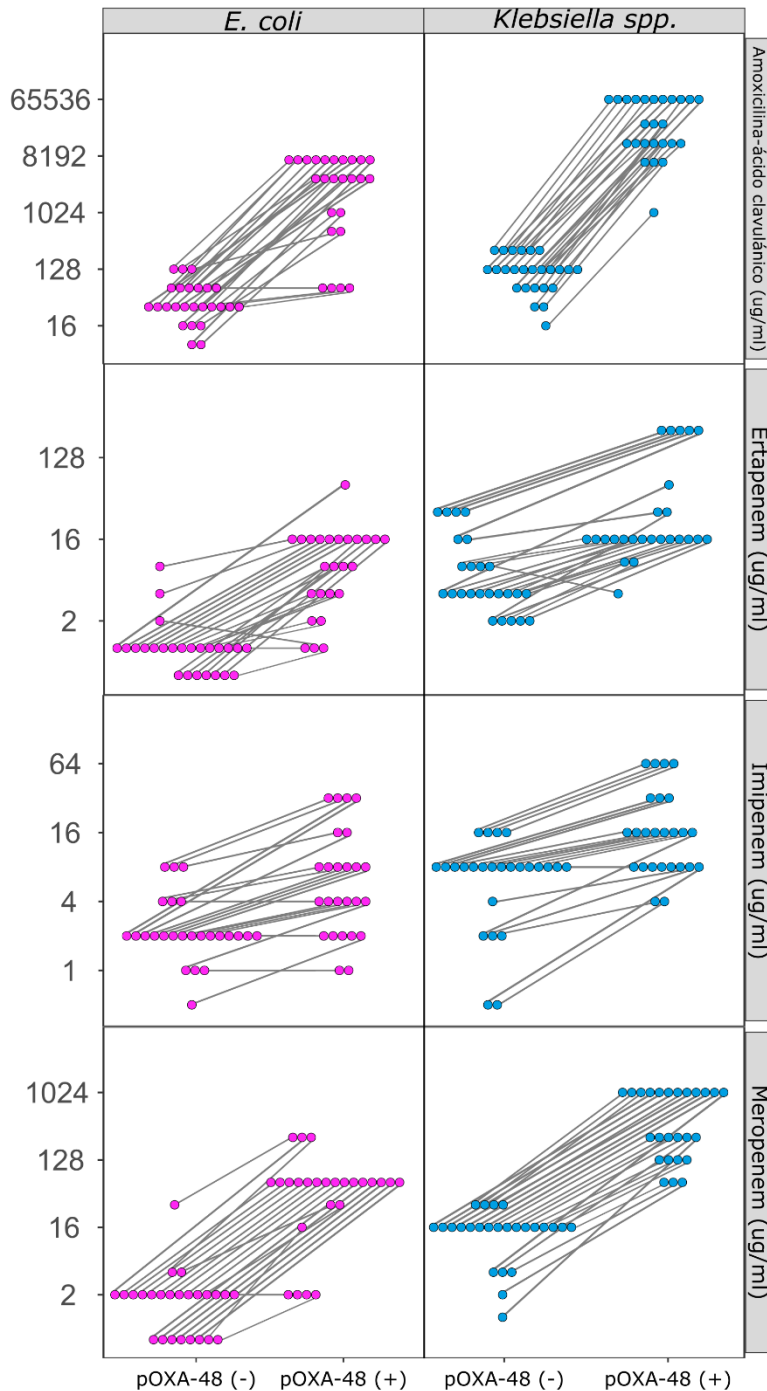
En este segundo capítulo, se realiza un análisis exhaustivo de las dinámicas de transmisión vertical y horizontal de pOXA-48 en enterobacterias clínicas, usando para ello, el modelo experimental desarrollado en el anterior capítulo: el plásmido conjugativo de resistencia a carbapenemas, pOXA-48\_K8; y una colección de enterobacterias isogénicas con y sin el plásmido, de origen clínico y ecológicamente compatibles con él, aisladas de la microbiota intestinal de pacientes de un hospital terciario de Madrid. Para ello, se combinan enfoques

experimentales *in vitro* e *in vivo*, que permiten comprender la distribución de pOXA-48 en las comunidades naturales de enterobacterias de la microbiota intestinal humana.

Este capítulo forma parte de una segunda publicación científica que se encuentra actualmente en proceso de escritura, y que será enviada para su publicación a lo largo de 2023.

*Diferencias en los niveles de resistencia antibiótica adquirida asociada a la presencia de pOXA-48\_K8.*

Para estudiar el impacto de la RAM asociada al plásmido en su transmisión vertical en presencia de antibióticos, se examinó el nivel de protección que el plásmido confiere a los distintos aislados de la colección de enterobacterias clínicas usada en este trabajo (ver Capítulo 1, Figura 12). Para ello se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cuatro antibióticos  $\beta$ -lactámicos de uso clínico en una colección de cepas isogénicas, con y sin el plásmido pOXA-48\_K8.



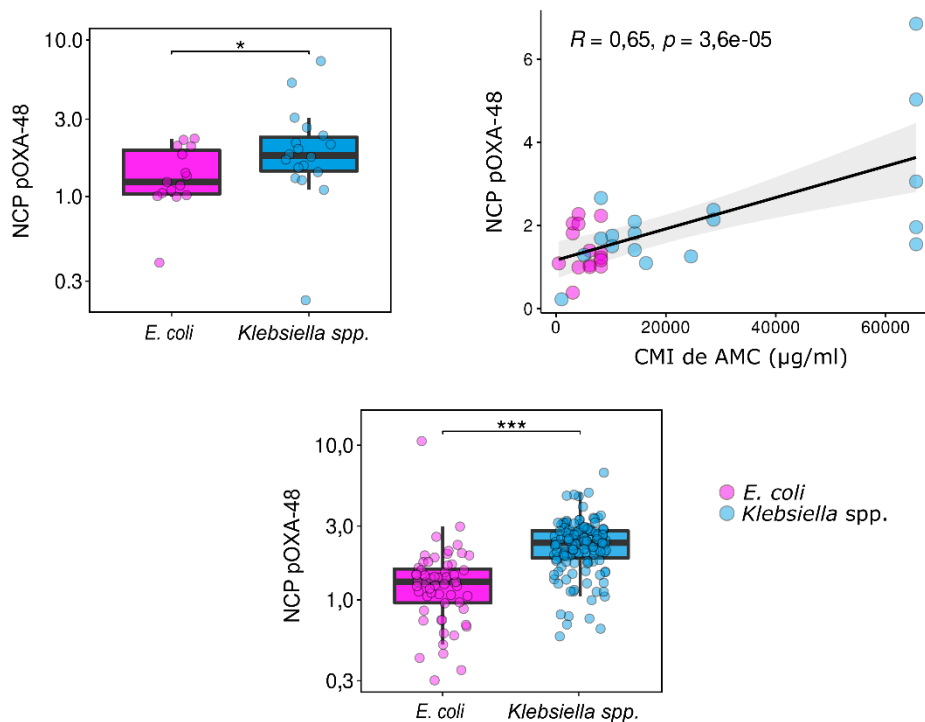
**Figura 20. Niveles de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de una colección de cepas isogénicas con y sin pOXA-48\_K8.** Valores de CMI de, amoxicilina-ácido clavulánico, ertapenem, imipenem y meropenem para una colección de enterobacterias clínicas y sus versiones isogénicas portadoras del plásmido pOXA-48\_K8. Los puntos representan las cepas (en rosa, *E. coli*; en azul, *Klebsiella spp.*) y las líneas grises unen las versiones sin plásmido (a la izquierda) y con plásmido (a la derecha) de una misma cepa. Se observan diferencias significativas entre especies en los valores de CMI de los clones sin pOXA-48\_K8 (prueba de los rangos con signo Wilcoxon: AMC,  $W=47,5$ ,  $P=0,001$ ; ERT,  $W=14,5$ ,  $P=8,68 \times 10^{-6}$ ; IMP,  $W=15$ ,  $P=5,16 \times 10^{-6}$ ; MER,  $W=56$ ,  $P=0,002$ ), así como entre la CMI de los clones portadores del plásmido (prueba de los rangos con signo Wilcoxon: AMC,  $W=27$ ,  $P=8,94 \times 10^{-5}$ ; ERT,  $W=82$ ,  $P=0,031$ ; IMP,  $W=29,5$ ,  $P=4,79 \times 10^{-5}$ ; MER,  $W=54$ ,  $P=0,002$ ).

Se probaron dos carbapenemas de marcada actividad antipseudomónica, imipenem (IMI) y meropenem (MER), y un tercero de limitada actividad antipseudomónica, ertapenem (ERT). El cuarto antibiótico utilizado fue amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), un antibiótico combinado compuesto por una penicilina semisintética (amoxicilina) y un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico), de amplio uso en clínica e integrante de la lista modelo de medicamentos esenciales elaborada por la OMS (<https://www.who.int/es/news/item/27-02-2020-who-launch-e-eml>).

Se midió el nivel de resistencia constitutivo de cada cepa parental sin pOXA-48\_K8 y el nivel de resistencia alcanzado por cada cepa cuando porta el plásmido (Figura 20). A partir de estos valores, se calculó el incremento en el nivel de resistencia asociado a la adquisición del plásmido para cada cepa. Si bien es cierto que se observaron diferencias significativas de los niveles constitutivos de resistencia entre especies, siendo las cepas de *Klebsiella spp.* más resistentes constitutivamente que las de *E. coli* (Figura 20, prueba de los rangos con signo Wilcoxon: AMC,  $W=47,5$ ,  $P=0,001$ ; ERT,  $W=14,5$ ,  $P=8,68 \times 10^{-6}$ ; IMP,  $W=15$ ,  $P=5,16 \times 10^{-6}$ ; MER,  $W=56$ ,  $P=0,002$ ), también existieron diferencias significativas en el nivel de resistencia adquirido asociado a la presencia del plásmido (Figura 20, prueba de los rangos con signo Wilcoxon: AMC,  $W=27$ ,  $P=8,94 \times 10^{-5}$ ; ERT,  $W=82$ ,  $P=0,031$ ; IMP,  $W=29,5$ ,  $P=4,79 \times 10^{-5}$ ; MER,  $W=54$ ,  $P=0,002$ ). pOXA-48\_K8 aporta niveles significativamente más altos de protección a los aislados de *Klebsiella spp.* que a los de *E. coli*, frente a los cuatro antibióticos evaluados (Figura 20).

La diversidad de los entornos genéticos y de contenido de genes de RAM de los aislados de este estudio hacen difícil elucidar el origen genético de las diferencias en los niveles de resistencia antibiótica asociada a la adquisición del plásmido pOXA-48 entre los clones de *Klebsiella spp.* y los de *E. coli*. Sin embargo, existe un aspecto que suele influenciar el nivel de RAM mediada por plásmidos, el número de copias del plásmido (NCP). Los niveles de RAM habitualmente escalan junto con el NCP, especialmente en el caso de aquellos mecanismos de RAM fuertemente dependientes de los niveles de expresión del gen, como ocurre con las carbapenemasas<sup>72,145</sup>. A partir de los datos de secuenciación del genoma se estimó el NCP de pOXA-48\_K8 en las cepas utilizadas en esta tesis (Figura 21a). Nótese que se han excluido del análisis del NCP algunos clones de ambas especies (10 *E. coli*; 7 *Klebsiella spp.*) que presentaban mutaciones cercanas al gen que codifica la proteína de replicación del plásmido RepA, produciendo un aumento anómalo del número de copias del plásmido. Los resultados mostraron que el NCP es significativamente mayor en *Klebsiella spp.* (media = 2,21, desvest = 1,53) que en *E. coli* (media = 1,41, desvest = 0,55) (Figura 21a; prueba de los rangos con signo de Wilcoxon,  $W = 76$ ,  $P = 0,03$ ). A continuación, se comparó el NCP de pOXA-48 y el nivel de RAM al antibiótico al cual pOXA-48 confiere los niveles de resistencia más altos, AMC (incremento medio de la CMI a AMC asociado a la adquisición de pOXA-48 = 244,7), observándose una correlación positiva entre el NCP y el nivel de resistencia a AMC alcanzado tras adquirir el plásmido (Figura 21b; correlación de Pearson,  $R = 0,64$ ,  $P = 3,6 \times 10^{-5}$ ). Estos resultados respaldan la idea de que

el NCP es, al menos en parte, responsable de que los clones del género *Klebsiella spp.* exhiban mayores niveles de resistencia a  $\beta$ -lactámicos asociados a la presencia de pOXA-48.



**Figura 21. Relación entre el NCP pOXA-48 y los niveles de RAM.** **a** NCP pOXA-48 en cepas transconjugantes de *E. coli* (n =15) y *Klebsiella spp.* (n =18), en rosa y azul respectivamente. Las líneas horizontales del interior de las cajas representan el valor medio, las bisagras superior e inferior corresponden a los percentiles 25 y 75, y los bigotes se extienden 1,5 veces el rango intercuartílico. Los puntos indican el NCP en cada cepa. **b** Correlación de Pearson entre el NCP pOXA-48 y el incremento de la CMI de AMC en las cepas utilizadas en este trabajo. **c** NCP pOXA-48 de aislados clínicos silvestres portadores de pOXA-48 (*E. coli*, n = 59; *Klebsiella spp.* n = 140). Los asteriscos representan significancia estadística de la diferencia de los valores de NCP entre las especies (\*P  $\leq$  0,05; \*\*P  $\leq$  0,01; \*\*\*P  $\leq$  0,001).

Finalmente, con el objetivo de investigar si las diferencias en el NCP observadas en este estudio se encuentran también presentes en aislados que portan pOXA-48 de forma natural, se usó la misma aproximación para analizar el NCP en una colección de 200 aislados portadores de pOXA-48 del hospital Ramón y Cajal de Madrid, caracterizados en nuestro grupo recientemente<sup>136</sup>. De acuerdo con los resultados mostrados arriba, se observó un NCP significativamente mayor en los aislados del género *Klebsiella spp.* (media = 2,35, desvest = 0,88) que en los de *E. coli* (media = 1,46, desvest = 1,33) (Figura 21c, prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, W =1271, P = 1,32 x 10<sup>-14</sup>).

Estos resultados revelan que, en condiciones de presión selectiva, el nivel de resistencia en los clones portadores de pOXA-48 es mayor en *Klebsiella spp.* que en *E. coli*.

#### *Análisis in vitro de las dinámicas de transmisión horizontal del plásmido pOXA-48\_K8 en aislados clínicos de Klebsiella spp. y E. coli.*

Para analizar las dinámicas de transmisión horizontal de pOXA-48 en sus hospedadores naturales, se determinó la capacidad de distintos aislados clínicos para adquirir el plásmido por conjugación.

Como receptores, se seleccionó un sub-conjunto de 10 aislados de *E. coli* y 10 aislados de *Klebsiella spp.* de la colección de enterobacterias clínicas usada en este trabajo. Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo con dos criterios: que fueran representativas de la diversidad genética de la colección y que mostrasen similares niveles de resistencia adquirida a  $\beta$ -lactámicos asociada a la presencia de pOXA-48\_K8, con el objetivo de evitar en lo posible los sesgos derivados de la presión selectiva. Todas las cepas receptoras, excepto tres (Kpn10, Kpn19 y Kpn21), portaban el plásmido de fluorescencia pBGC, no movilizable, descrito previamente (ver apartado [Construcción del plásmido pBGC](#) en Materiales y métodos). Como donadores, se seleccionaron tres cepas portadoras del plásmido pOXA-48\_K8 diferentes: *E. coli*  $\beta$ 3914/pOXA-48\_K8, una cepa de laboratorio auxótrofa para DAP; un aislado clínico de *K. pneumoniae* ST11, conocido “super-diseminador” de este plásmido; y un aislado clínico de *E. coli* ST10, típicamente asociado a pOXA-48 (ver apartado [Determinación de frecuencias de conjugación in vitro](#) en Materiales y Métodos)

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de conjugación con un donador y un receptor en iguales proporciones, con todas las posibles combinaciones donador-receptor. Se midió la frecuencia de conjugación como el ratio entre el número de transconjugantes (TC) y el número total de receptores (R) (véase [Determinación de frecuencias de conjugación in vitro](#) en Materiales y métodos). Se observaron frecuencias de conjugación significativamente mayores en los receptores del género *Klebsiella spp.* que en los de *E. coli*, patrón que se repitió con todos los donadores probados (Figura 22a, prueba Kruskal-Wallis: *E. coli*  $\beta$ 3914,  $X^2 = 45.8$ ,  $P = 1.9 \times 10^{-11}$ ; *K. pneumoniae* ST11,  $X^2 = 6.98$ ,  $P = 8.24 \times 10^{-3}$ ; *E. coli* ST10,  $X^2 = 34.1$ ,  $P = 5.16 \times 10^{-9}$ ). Por otro lado, se observó una discreta influencia del donador en las frecuencias de conjugación de los receptores de *E. coli* (Figura 22a, prueba Kruskal-Wallis: *E. coli*,  $X^2 = 21.7$ ,  $P = 1.9 \times 10^{-5}$ ; *Klebsiella spp.*,  $X^2 = 4.47$ ,  $P = 0.11$ ), que en ningún caso afecta a las diferencias en las frecuencias de conjugación entre las especies receptoras.

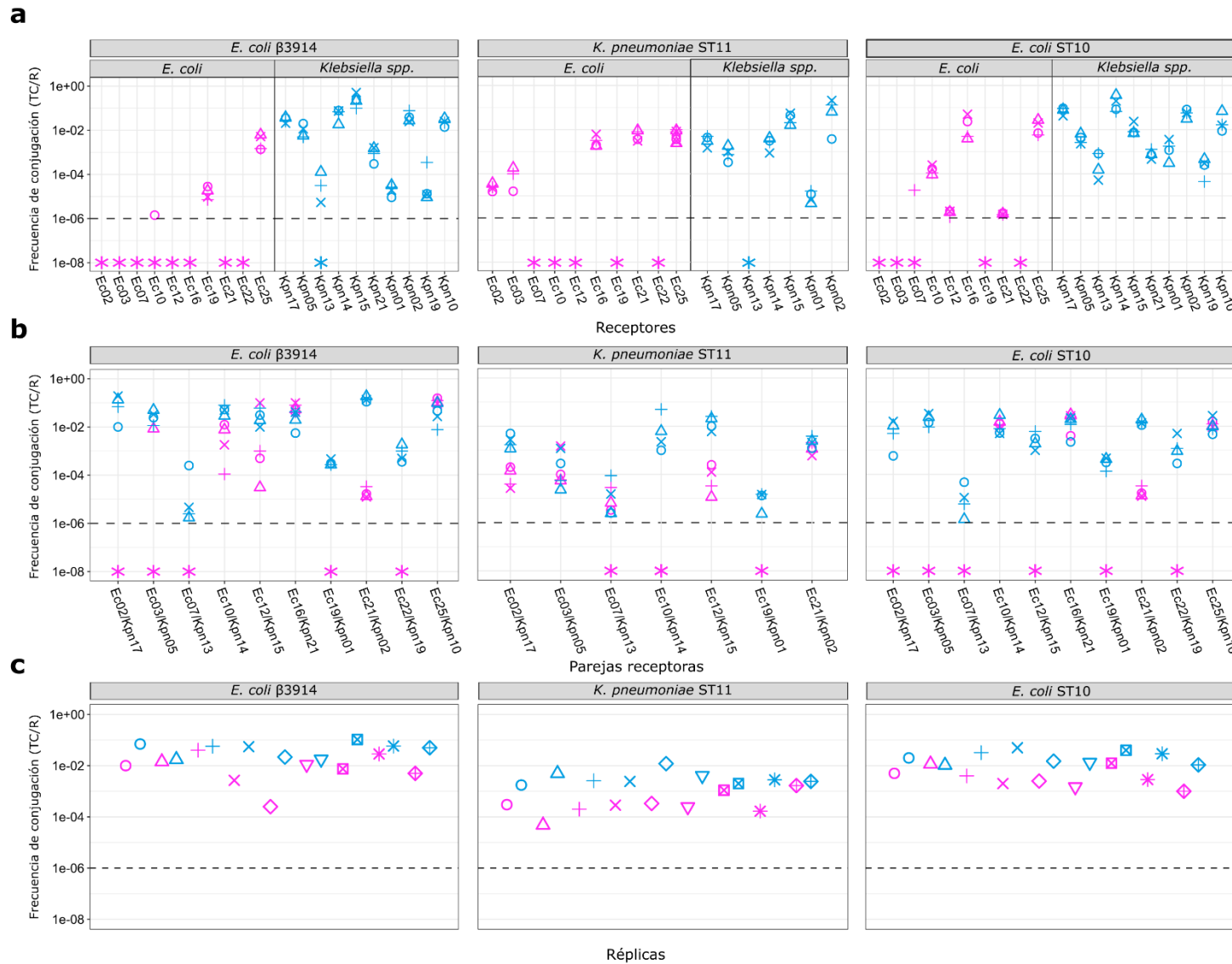
Sin embargo, la microbiota intestinal es una comunidad compleja en la cual tienen lugar interacciones ecológicas entre las bacterias que pueden afectar a la transmisión horizontal de los plásmidos. Con el objetivo de estudiar cómo el incremento de la complejidad de la comunidad de receptores afectaría a las frecuencias de conjugación observadas en el experimento anterior, se realizaron conjugaciones “por parejas”, en las cuales se mezclaron, en iguales proporciones dos cepas receptoras de diferentes especies, al mismo tiempo y con el mismo donador. Así, se formaron al azar 10 parejas de receptores compuestas por un aislado de *E. coli* y uno de *Klebsiella spp.* Se llevaron a cabo conjugaciones con cada pareja y cada donador, y se calcularon las frecuencias de conjugación de cada integrante de la pareja de receptores distinguiendo entre ellos por color, gracias al uso de un medio cromogénico diferencial. Los resultados siguieron el mismo patrón observado en las conjugaciones con un solo receptor, los aislados de *Klebsiella spp.* exhibieron una mayor permisividad en la captación del plásmido, registrando frecuencias de conjugación por receptor significativamente más altas que los aislados de *E. coli* (Figura 22b, prueba de rangos de Wilcoxon pareada: *E. coli*  $\beta$ 3914,  $V = 235$ ,  $p$ -valor = 0,017;

*K. pneumoniae* ST11,  $V = 45$ ,  $p$ -valor = 0,00012; *E. coli* ST10,  $V = 205$ ,  $p$ -valor = 0,01), independientemente del donador empleado. En cuanto a la influencia del donador, en este caso no se observan diferencias significativas entre donadores para ninguna de las dos especies (Figura 22b, prueba Kruskal-Wallis: *E. coli*,  $X^2 = 0,89$ ,  $P = 0,64$ ; *Klebsiella spp.*,  $X^2 = 5,9$ ,  $P = 0,08$ ).

Cabe señalar que, debido a la imposibilidad de distinguir, ni por color ni por selección antibiótica, entre el donador *K. pneumoniae* ST11y aquellos receptores de este género que no portaban pBGC, no se obtuvieron datos de tres de los receptores del género *Klebsiella spp.* con este donador (detalles en [Determinación de frecuencias de conjugación in vitro](#) en Materiales y métodos), ni en las conjugaciones con un solo receptor ni en las conjugaciones por parejas.

Finalmente, con el objetivo de seguir aumentando la complejidad de la comunidad de receptores en las conjugaciones, se llevaron a cabo conjugaciones en *pool*, en las cuales se mezclaron en iguales proporciones todos los receptores utilizados en los ensayos de conjugación, de ambas especies, y se conjugaron al mismo tiempo con el mismo donador. El experimento se llevó a cabo con los tres donadores. Nótese que, en este caso, no fue posible distinguir entre cepas de la misma especie, de forma que los resultados muestran un perfil de conjugación para cada especie, cuyos valores corresponderían a las cepas más exitosas en la captación del plásmido por conjugación. Nuevamente se observa que *Klebsiella spp.* registra frecuencias de conjugación más altas que *E. coli*, con independencia del donador empleado (Figura 22c, prueba Kluskal-Wallis: *E. coli*  $\beta$ 3914,  $X^2 = 9,28$ ,  $P = 2,32 \times 10^{-3}$ ; *K. pneumoniae* ST11,  $X^2 = 12,8$ ,  $P = 3,49 \times 10^{-4}$ ; *E. coli* ST10,  $X^2 = 9,31$ ,  $P = 2,35 \times 10^{-3}$ ). En este caso, si se observaron diferencias significativas en la influencia de los donadores en ambas especies (Figura 22c, prueba Kluskal-Wallis: *E. coli*,  $X^2 = 15,1$ ,  $P = 5,2 \times 10^{-4}$ ; *Klebsiella spp.*,  $X^2 = 18,8$ ,  $P = 8,4 \times 10^{-5}$ ).

Estos resultados indican que las cepas del género *Klebsiella* son, en general, más receptivas a la captación del plásmido pOXA-48\_K8 que las de *E. coli*.



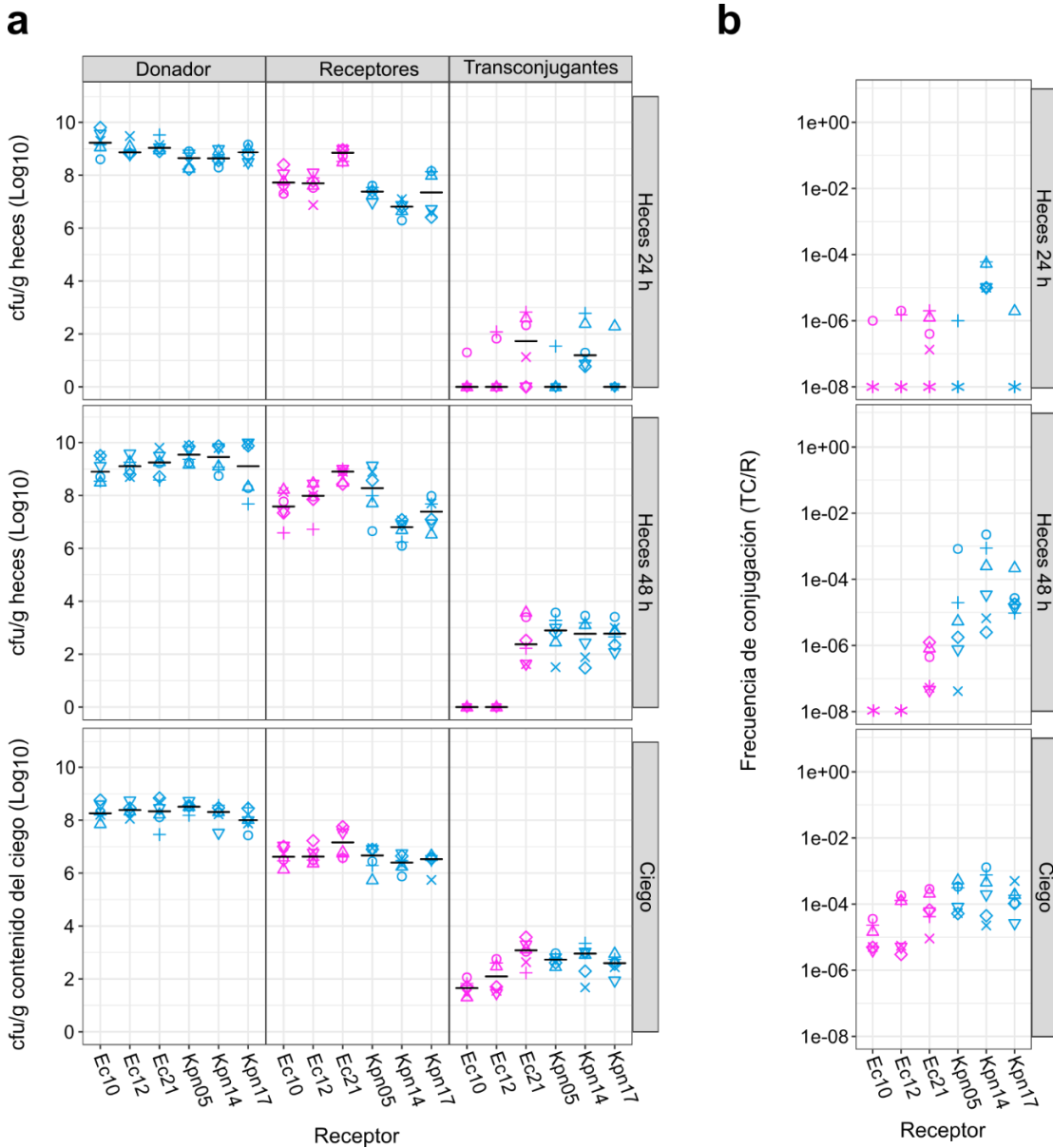
**Figura 22. Diferencias en la transmisión horizontal del plásmido pOXA-48 en una colección de enterobacterias clínicas.** Frecuencias de conjugación de un set de 20 aislados de la colección de enterobacterias clínicas (10 *E. coli* y 10 *Klebsiella spp.*), obtenidas con tres donadores distintos (*E. coli*  $\beta$ 3914, izquierda; *K. pneumoniae* ST11, centro; y *E. coli* ST10, derecha), en ensayos de conjugación de un receptor y un donador; **b** “por parejas”, con dos receptores al mismo tiempo y un solo donador, en iguales proporciones; y **c** en *pool*, con todos los receptores a la vez y un donador por ensayo. Los símbolos representan las réplicas biológicas (**a,b**, n=4; **c**, n=9) y el color las especies (rosa, *E. coli*; azul, *Klebsiella spp.*). Los asteriscos simbolizan frecuencias de conjugación por debajo del límite de detección, indicado con una línea discontinua. Se observan frecuencias de conjugación significativamente mayores en los aislados de *Klebsiella spp.* que en los de *E. coli* en todas las modalidades del experimento con independencia del donador.

*Análisis in vivo de las dinámicas de transmisión horizontal del plásmido pOXA-48\_K8 en aislados clínicos de Klebsiella spp. y E. coli.*

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos *in vitro* en un entorno más significativo, se utilizó un modelo de colonización intestinal de ratón. Como receptores se seleccionaron, de entre las cepas receptoras de los ensayos *in vitro*, seis clones portadores del plásmido de fluorescencia pBGC (*E. coli*, Ec10, Ec12 y Ec21; y *K. pneumoniae*, Kpn17, Kpn05 y Kpn14). Los clones seleccionados eran representativos de la variabilidad de frecuencias de conjugación observadas en cada especie. Como donador se escogió la cepa silvestre portadora de pOXA-48\_K8, *K. pneumoniae* K93, perteneciente al ST11, por su demostrada habilidad colonizadora y diseminadora del plásmido pOXA-48 en microbiotas intestinales de pacientes hospitalizados<sup>136,138</sup>. Los ratones (n=21) recibieron tratamiento antibiótico oral durante la semana previa a la realización del experimento con el objetivo de eliminar la resistencia a la colonización (véase [Determinación de frecuencias de conjugación in vivo](#) en Material y Métodos). Un día después de la finalización del tratamiento se procedió a la inoculación de las bacterias donadora y receptoras. Todos los ratones, excepto tres, fueron infectados con el donador, y una hora después, con los distintos receptores. Cada ratón fue infectado con una sola cepa receptora, a razón de tres ratones por receptor. Nótese que, dado que el experimento se realizó en ausencia de presión antibiótica, tres ratones se mantuvieron sin infectar a lo largo del mismo, como control de la reaparición de microbiota residente. Se realizaron dos réplicas del experimento con 3 meses de diferencia (datos compilados en Figura 23).

Se recogieron muestras fecales frescas a las 24 h y a las 48 h tras la infección, momento en el cual los ratones fueron sacrificados. Tras el sacrificio se obtuvieron también muestras del contenido del ciego. El procesamiento de las muestras y la determinación de las densidades de donadores, receptores y transconjugantes se realizó como se describe en el apartado correspondiente de [Material y Métodos](#). A partir de las densidades de transconjugantes y receptores se calcularon las frecuencias de conjugación (véase [Determinación de frecuencias de conjugación in vivo](#) en Material y Métodos). Se observaron buenos niveles de colonización del donador y todos los receptores tanto en las muestras fecales recogidas a las 24 h y 48 h, como en el contenido del ciego (Figura 23a). Sin embargo, a las 24 h se detectó un bajo nivel de transconjugantes en ambas especies (Figura 23a), dando lugar a frecuencias de conjugación bajas, donde no se observaron diferencias significativas entre los receptores de las distintas especies (Figura 23b, prueba de Kruskal-Wallis,  $H = 1,24$ ,  $P = 0,265$ ). Por el contrario, a las 48 h tras la infección, mientras que los niveles de colonización de donador y receptores se mantuvieron constantes aumentó la presencia de transconjugantes procedentes de 4 de los 6 receptores utilizados (Ec 21, Kpn05, Kpn14 y Kpn17; Figura 23a), dando lugar a frecuencias de conjugación más altas en estos casos. Se observan diferencias significativas en las frecuencias de conjugación entre especies: los receptores de *Klebsiella spp.* mostraron frecuencias de conjugación significativamente más altas que los de *E. coli*. (Figura 23b, prueba Kruskal-Wallis,  $H = 24,6$ ,  $P = 6,89 \times 10^{-7}$ ).

Finalmente, en el contenido del ciego, los resultados siguieron el mismo patrón observado en las muestras de heces recogidas a las 48 h: los receptores de *Klebsiella spp.* mostraron mayores frecuencias de conjugación (Figura 23b, prueba Kruskal-Wallis,  $H = 10,2$ ,  $P = 1,4 \times 10^{-3}$ ).



**Figura 23. Ensayos de conjugación *in vivo* en un modelo de ratón. a.** Niveles de colonización del donador (*K. pneumoniae* ST11) y los receptores (3 *E. coli* y 3 *Klebsiella spp.* libres de pOXA-48 y portadores de pBGC), y niveles de transconjugantes detectados en heces a las 24 y 48 h (arriba y centro) y en el contenido del ciego (abajo). Las especies se representan por colores (rosa, *E. coli*; azul, *Klebsiella spp.*) y las réplicas biológicas ( $n=6$ ) están representadas con símbolos (cada símbolo representa un ratón). La línea negra indica la mediana de las réplicas biológicas. Los niveles de colonización del donador y los receptores fueron altos tanto en heces a las 24 y 48 h como en ciego (48 h). A las 24 h se detectaron niveles bajos de transconjugantes procedentes de todos los receptores. **b.** Frecuencias de conjugación de los distintos receptores en heces a las 24 y 48 h (arriba y centro) y en ciego (abajo). Las frecuencias de conjugación a las 24 h son bajas en todos los casos y no se detectan diferencias significativas entre las especies receptoras (prueba Kruskal-Wallis,  $H = 1,24$ ,  $P = 0,265$ ). Sin embargo, a las 48 h, las frecuencias de conjugación aumentan, siendo estas significativamente mayores en los receptores del género *Klebsiella*., tanto en heces como en ciego (prueba de Kruskal-Wallis, heces 48 h,  $H = 24,6$ ,  $P = 6,89 \times 10^{-7}$ ; ciego,  $H = 10,2$ ,  $P = 1,4 \times 10^{-3}$ ).

Las frecuencias de conjugación determinadas *in vivo* siguen la misma tendencia observada en las frecuencias de conjugación determinadas *in vitro* (Figura 22), confirmando la mayor permisividad del género *Klebsiella spp.* en la captación de pOXA-48 por conjugación.



## DISCUSIÓN



## Determinación de la distribución de los efectos de *fitness* del plásmido pOXA-48 en un conjunto de enterobacterias ecológicamente compatibles

En el primer capítulo de esta tesis doctoral se determinaron los efectos de *fitness* de un plásmido de resistencia a carbapenemas en una colección de 50 cepas silvestres aisladas de la microbiota intestinal humana. pOXA-48\_K8 resultó no producir efectos significativos en la mayoría de los aislados, resultando en cambio significativamente costoso o beneficioso en algunos de ellos (Figura 13). Al mismo tiempo, no se observaron diferencias significativas en los efectos de *fitness* asociados a la adquisición del plásmido entre las especies de la colección.

No obstante, esto hizo que la distribución de los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 en la población presentara una forma simétrica, con un coste medio de *fitness* pequeño y colas que se expanden hacia efectos de *fitness* negativos y positivos (Figura 15), lo que contrastaba con la distribución de efectos de *fitness* recogidos en el metaanálisis de Vogwill y MacLean<sup>177</sup>. Aunque los plásmidos estudiados en los informes recogidos en dicho trabajo se aislaron de fuentes naturales, se introdujeron en huéspedes bacterianos que no necesariamente se recuperaron de las mismas fuentes, y los efectos de *fitness* detectados pueden no ser representativos de las asociaciones plásmido-bacteria que ocurren en el ambiente natural. Nuestro estudio, en cambio, analiza los efectos de *fitness* de pOXA-48\_K8 en hospedadores bacterianos ecológicamente compatibles. La discrepancia entre estas distribuciones puede, al menos en parte, reflejar la distinta naturaleza de las asociaciones plásmido-bacteria consideradas en los distintos estudios. En conjunto, los datos sugieren que la distribución de los efectos de *fitness* de los plásmidos se ve influida por la compatibilidad ecológica de éstos y sus hospedadores bacterianos.

Los resultados de esta tesis doctoral muestran que un plásmido puede producir efectos muy variados en el *fitness* de distintos hospedadores naturales. Dos de los factores que determinan la permanencia de los plásmidos en las comunidades son el coste en *fitness* que éstos impongan en sus hospedadores y su transmisión por conjugación a través de la comunidad bacteriana. Al integrar los efectos de *fitness* determinados experimentalmente en un modelo matemático simple, éste reveló que: i) al incrementar la variabilidad de efectos de *fitness* entre los hospedadores, la persistencia del plásmido en la población se vuelve menos dependiente de la conjugación; y ii) a medida que aumenta el número de especies que integran una comunidad, se incrementa también la probabilidad de que el plásmido persista en dicha comunidad (Figura 19). Esta observación está en consonancia con estudios recientes que muestran como la complejidad de una comunidad puede promover la estabilidad de los plásmidos a través de la dinámica de transferencia de plásmidos basada en clones “fuente-sumidero”<sup>78</sup> y al proporcionar múltiples filotipos bacterianos permisivos con el plásmido<sup>83</sup>.

Otro resultado particularmente interesante de este capítulo es el elevado coste en *fitness* que el plásmido pOXA-48\_K8 produce en los aislados de *K. pneumoniae* ST1427 (Figura 16). Este ST está infrarrepresentado entre los aislados de *K. pneumoniae* portadores de pOXA-48 en la colección original del proyecto R-GNOSIS, del que también provienen las cepas seleccionadas para este estudio, y entre los que predomina el ST11 como portador del plásmido pOXA-48<sup>136,137</sup>. Entre los cuatro clones de *K. pneumoniae* ST11 usados en este estudio, pOXA-48\_K8 produce efectos de *fitness* no significativos (Kpn07, Kpn20, Kpn23) e incluso beneficiosos (Kpn22; Figura 16). A pesar del pequeño número de clones de *K. pneumoniae* analizados en este estudio, los resultados sugieren que las diferencias genéticas entre cepas de la misma especie pueden explicar las diferencias en el coste en *fitness* producido por el plásmido, dictando de alguna forma la epidemiología de las asociaciones plásmido-bacteria en entornos clínicos. Para dilucidar las causas genéticas que subyacen a este fenómeno, así como las interacciones específicas entre los efectos de *fitness* del plásmido y la filogenia, sería necesario analizar un número mayor de cepas de *K. pneumoniae* de distintos ST.

Los resultados del primer capítulo de esta tesis doctoral contribuyen a explicar la alta prevalencia de los plásmidos en las comunidades bacterianas a largo plazo. No obstante, también sugieren que la formación de asociaciones específicas entre ciertos clones bacterianos y plásmidos de RAM, observada en estudios epidemiológicos previos, no puede ser explicada exclusivamente en términos de efectos de *fitness* del plásmido en el hospedador.

### **Análisis de las transmisiones vertical y horizontal de pOXA-48 en un conjunto de enterobacterias ecológicamente compatibles**

En el segundo capítulo de este trabajo se procedió a explorar las dinámicas de transmisión vertical y horizontal de plásmido pOXA-48\_K8 en la colección de enterobacterias silvestres utilizada en el primer capítulo. En primer lugar, se observó que los aislados de *Klebsiella spp.* portadores de pOXA-48\_K8 presentaban un nivel de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos testados, significativamente mayor que aquellos de *E. coli*. Este hecho impactaría de forma efectiva sobre su capacidad de transmitir el plásmido verticalmente en presencia de selección antibiótica: una mayor resistencia podría implicar una mayor tasa de supervivencia y replicación de los clones de *Klebsiella spp.*, resultando en una mayor transmisión vertical del plásmido pOXA-48\_K8. Los niveles de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos adquiridos, asociados a la presencia del plásmido, correlacionan con el NCP pOXA-48, que es significativamente mayor en los aislados del género *Klebsiella spp.* que en los de *E. coli*. Es sabido que el número de copias del plásmido en los distintos hospedadores determina los niveles de RAM<sup>194</sup>, por lo que las diferencias en el NCP entre ambas especies, contribuiría a explicar las diferencias observadas en los niveles de resistencia aportados por pOXA-48 en *Klebsiella spp.* y *E. coli*. Este trabajo deja, además, la puerta abierta para el estudio de posibles efectos sinérgicos entre la  $\beta$ -lactamasa OXA-48 y otros mecanismos de resistencia codificados en la célula o sistemas de regulación de la expresión del gen de *bla*<sub>OXA-48</sub>.

Por otro lado, al analizar las dinámicas de transmisión horizontal en un subconjunto de esta población se observó que los clones de *Klebsiella spp.* eran significativamente más permisivos en la captación de pOXA-48\_K8 que los de *E. coli*.

También cabe destacar algunas observaciones especialmente notables. Los dos aislados de *K. pneumoniae* ST1427 incluidos en el análisis (Kpn01 y Kpn13) presentan una frecuencia de recepción del plásmido cuantitativamente más baja que el resto de su especie. Estos clones no sólo presentan una baja permisividad en la captación de pOXA-48\_K8 por conjugación, si no que este produce elevados costes en *fitness* en ellos. La combinación de ambos resultados podría explicar la infrarrepresentación de clones portadores de pOXA-48 pertenecientes a este ST<sup>136,137</sup>. Por otro lado, ciertos clones de *E. coli* (Ec 21 y Ec25) también destacan por presentar frecuencias de conjugación cuantitativamente mayores que el resto de los receptores de su especie (Figura 19). Estas observaciones sugieren que la captación por conjugación de un plásmido no vendría solo determinada a nivel de especie sino también por rasgos particulares de los distintos clones. Existen factores de conocida influencia sobre la captación de un plásmido por conjugación y su posterior estabilización en la célula<sup>195-198</sup>, sin embargo, la variedad de fondos genéticos usados en este trabajo hace difícil discriminarlos, por lo que serían necesarios exhaustivos análisis genómicos y consultas en la base de datos.

Los resultados del segundo capítulo de esta tesis doctoral sugieren que las dinámicas de transmisión vertical y horizontal de pOXA-48 en los distintos clones determinan su distribución en la población, así como la formación de asociaciones particularmente exitosas entre el plásmido y algunos de estos clones. Por otro lado, también ponen de manifiesto que la variabilidad de especies y clones en la comunidad favorece la persistencia del plásmido en la misma probablemente mediante dinámicas de transferencia entre clones “fuente-sumidero”<sup>78</sup>. Esta misma consecuencia, que la complejidad de la comunidad promueva la estabilidad del plásmido, es lo que observamos en el primer capítulo de este trabajo, como consecuencia de los diferentes efectos de *fitness* que el plásmido produce en los distintos hospedadores.

Las enterobacterias del tracto gastrointestinal humano están expuestas a un ambiente cuyas condiciones pueden variar temporalmente, por ejemplo, cuando el hospedador está sometido a tratamiento antibiótico. Este escenario es particularmente relevante en el caso de las enterobacterias portadoras de plásmidos de RAM, ya que la exposición a pulsos esporádicos de selección antibiótica favorece el mantenimiento de estos plásmidos en la comunidad<sup>199</sup>. Esta teoría defiende que dado el coste en *fitness* que los plásmidos imponen en sus hospedadores en ausencia de presión selectiva, el mantenimiento infeccioso del plásmido en la población requerirá la presencia de células libres de dicho plásmido que actúen como potenciales receptoras. Por ello, pulsos débiles y temporales de selección antibiótica permitirían, por un lado, mantener por transmisión vertical al plásmido en los linajes portadores y por otro, sobrevivir a esos pulsos a una porción de bacterias no-portadoras de este que a su vez

actuarían como potenciales receptores del plásmido. La integración de esta teoría con los resultados de este trabajo podría contribuir a explicar la prevalencia y distribución de pOXA-48 en las comunidades de enterobacterias del tracto gastrointestinal humano.

Primero, la aplicación de un tratamiento puntual con un antibiótico  $\beta$ -lactámico (p.ej. tratamiento de una infección respiratoria<sup>200,201</sup> o profilaxis preoperatoria<sup>202,203</sup>) enriquecería la población tanto con clones portadores de pOXA-48 como con clones libres de éste con niveles de resistencia constitutivos altos. Los resultados experimentales aquí mostrados señalan que esto implicaría un enriquecimiento en clones pertenecientes al género *Klebsiella spp.*, tanto portadores de pOXA-48 garantizando la permanencia de este por expansión clonal<sup>138,204</sup>, como libres de plásmido (por su mayor resistencia constitutiva) y potenciales captadores. En segundo lugar, una vez finalizado el tratamiento, el plásmido se mantendría en la comunidad a través de la transferencia vertical y horizontal. En este caso, *Klebsiella spp.* ha demostrado ser, también, más receptiva a la captación del plásmido por conjugación, por lo que el plásmido no sólo se mantendría en la comunidad, sino que la población portadora de pOXA-48 estaría mayoritariamente integrada por clones de este género. La combinación entre la permisividad en la captación del plásmido y su capacidad de sobrevivir a elevadas concentración de antibiótico contribuirían a explicar el hecho de que *K. pneumoniae* sea la especie más frecuente de entre las enterobacterias productoras de carbapenemasas recogidas en distintos estudios epidemiológicos<sup>129,205,206</sup>, siendo OXA-48 la más frecuente de estas carbapenemasas<sup>129,207</sup>. Además, la presencia de ciertos clones de *E. coli* particularmente receptivos a la captación del plásmido, cuyas tasas de conjugación podrían mantener el plásmido también en esta especie, soportaría el hecho de que *E. coli* constituya la segunda especie de entre las enterobacterias portadoras de carbapenemasas más frecuentemente asociada a OXA-48<sup>137,208,209</sup>, cuyo incremento en los últimos años resulta de gran interés clínico y epidemiológico<sup>114</sup>.

Una de las principales limitaciones experimentales del estudio realizado en el Capítulo 1, es que la determinación de los efectos de *fitness* se hace enteramente *in vitro*. Ésta es una práctica estándar en el campo que correlaciona adecuadamente con las observaciones *in vivo*<sup>177</sup>. Sin embargo, nuestros resultados podrían no ser completamente representativos de lo que ocurra en el intestino humano. En el Capítulo 2 se realizaron ensayos de conjugación *in vivo* utilizando un modelo de ratón. Las frecuencias de conjugación observadas *in vivo* confirman las observadas *in vitro*, indicando que los resultados de este trabajo podrían constituir una buena representación de las dinámicas de transmisión de pOXA-48\_K8 en el tracto gastrointestinal.

## Reflexiones finales

La naturaleza compleja y policlonal de la mayoría de las comunidades bacterianas naturales atestigua la probable relevancia de nuestros hallazgos para explicar la altísima prevalencia de plásmidos en las poblaciones de bacterias naturales<sup>210</sup>. La microbiota del tracto gastrointestinal humano se

compone de una gran variedad de bacterias pertenecientes a cientos de especies<sup>211</sup>, incluyendo varias especies del orden *Enterobacterales*<sup>212</sup>. El sistema experimental de este trabajo está, de hecho, inspirado por las dinámicas de los plásmidos de tipo pOXA-48 en la microbiota intestinal de pacientes hospitalizados. En un estudio reciente de nuestro grupo se observó que, una vez que un paciente es colonizado por un clon portador de pOXA-48, el plásmido se propaga por conjugación a otras enterobacterias residentes, persistiendo en el tracto gastrointestinal de los pacientes y pudiendo ser detectados incluso meses o años después<sup>136</sup>. En un estudio posterior de nuestro grupo, usando este mismo sistema experimental, se detectaron eventos de evolución compensatoria del coste en *fitness* del plásmido pOXA-48 *in vivo* en la microbiota de estos pacientes durante su estancia en el hospital<sup>72</sup>.

Una importante limitación de esta tesis es que, aunque se han usado clones libres de pOXA-48 aislados de pacientes sin registro de colonización previa por enterobacterias portadoras de pOXA-48, es imposible descartar la posibilidad de la presencia previa de un plásmido de tipo pOXA-48 en estos aislados, que podría haber dado lugar a la preexistencia de mutaciones compensatorias que pudieran afectar tanto a los efectos de *fitness* producidos por pOXA-48\_K8 como a las transferencias vertical y horizontal observadas en este estudio.

Por último, a la luz de estos resultados, sería interesante explorar sistemas *in vitro* más complejos<sup>213</sup>, incorporando mayor número de especies implicadas, o dinámicas de evolución plásmido-hospedador; así como modelos *in vivo*, que integren la medición de efectos de *fitness* y de las dinámicas de transmisión horizontal, en presencia o ausencia de distintos niveles de presión antibiótica, en una comunidad más compleja.



## CONCLUSIONES



1. El plásmido pOXA-48\_K8, portador de la carbapenemasa OXA-48, de gran relevancia clínica produce un amplio rango de efectos de *fitness* en sus hospedadores bacterianos naturales.
2. Las diferencias genéticas entre los distintos clones de la colección de estudio pueden explicar parcialmente las diferencias en los efectos de *fitness* que el plásmido produce en cada uno de ellos.
3. Como resultado de la variabilidad en los efectos de *fitness* que pOXA-48\_K8 produce en los distintos hospedadores la persistencia del plásmido es menos dependiente de la conjugación y aumenta con la complejidad de la comunidad.
4. El plásmido pOXA-48\_K8 confiere un amplio rango de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en los hospedadores bacterianos utilizados en este trabajo.
5. La adquisición de pOXA-48\_K8 induce un mayor aumento de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en los clones pertenecientes al género *Klebsiella spp.* que en los de la especie *E. coli* analizados.
6. Los aislados del género *Klebsiella spp.* presentan una mayor permisividad a la captación del plásmido pOXA-48\_K8 por conjugación que los de *E. coli* analizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, favoreciendo la transmisión horizontal del plásmido entre clones del género *Klebsiella spp.*
7. Los efectos de *fitness* asociados a la presencia de pOXA-48\_K8, así como la dinámica de transmisión vertical y horizontal del plásmido, determinados en la colección de aislados clínicos utilizada en esta tesis, contribuyen a explicar la permanencia y distribución del plásmido pOXA-48 en las poblaciones de enterobacterias de la microbiota intestinal humana.



## CONCLUSIONS



1. The pOXA-48\_K8 plasmid, carrying the clinically relevant carbapenemase OXA-48, produces a wide range of *fitness* effects in its natural bacterial hosts.
2. Genetic differences between strains in the collection can partially explain the differences in the plasmid *fitness* effects.
3. As a result of the distribution of pOXA-48\_K8 fitness effects across different bacterial hosts, plasmid persistence becomes less dependent on conjugation and increases with community complexity.
4. The pOXA-48\_K8 plasmid confers a broad range of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in the bacterial hosts analyzed in this study.
5. Acquisition of pOXA-48\_K8 induces a greater increase in  $\beta$ -lactam antibiotic resistance in the clones belonging to the genus *Klebsiella* than in those of *E. coli* analyzed in this study.
6. *Klebsiella spp.* isolates are more permissive to pOXA-48\_K8 plasmid uptake by conjugation than *E. coli* isolates analyzed in this study, favoring horizontal transmission of the plasmid in clones belonging to *Klebsiella spp.*
7. The fitness effects associated with the presence of pOXA-48\_K8, as well as the vertical and horizontal transmission dynamics of the plasmid, determined in the collection of clinical isolates used in this thesis, contribute to explain the permanence and distribution of the pOXA-48 plasmid in enterobacteria in the human gut microbiota.



## BIBLIOGRAFÍA



1. Meinhardt, F., Schaffrath, R. & Larsen, M. Microbial linear plasmids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1997 47:4 **47**, 329–336 (1997).
2. LEDERBERG, J. Cell Genetics and Hereditary Symbiosis. <https://doi.org/10.1152/physrev.1952.32.4.403> **32**, 403–430 (1952).
3. Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:9 **3**, 711–721 (2005).
4. Almpanis, A., Swain, M., Gatherer, D. & McEwan, N. Correlation between bacterial G+C content, genome size and the G+C content of associated plasmids and bacteriophages. *Microb Genom* **4**, e000168 (2018).
5. Hall, J. P. J., Botelho, J., Cazares, A. & Baltrus, D. A. What makes a megaplasmid? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **377**, (2022).
6. Thomas, C. M. Paradigms of plasmid organization. *Mol Microbiol* **37**, 485–491 (2000).
7. Garcillán-Barcia, M. P., Alvarado, A. & de la Cruz, F. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 936–956 (2011).
8. Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. & Toussaint, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:9 **3**, 722–732 (2005).
9. Harrison, E. & Brockhurst, M. A. Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol* **20**, 262–267 (2012).
10. del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M. & Díaz-Orejas, R. Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 434–464 (1998).
11. Novick, R. P. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* **51**, 381–395 (1987).
12. Solar, G. del & Espinosa, M. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol* **37**, 492–500 (2000).
13. Summers, D. K. & Sherratt, D. J. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: Cole 1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* **36**, 1097–1103 (1984).
14. Baxter, J. C. & Funnell, B. E. Plasmid Partition Mechanisms. *Microbiol Spectr* **2**, (2014).
15. Hayes, F. Toxins-Antitoxins: Plasmid Maintenance, Programmed Cell Death, and Cell Cycle Arrest. *Science* (1979) **301**, 1496–1499 (2003).
16. Elwell, L. P. & Shipley, P. L. Plasmid-Mediated Factors Associated with Virulence of Bacteria to Animals. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.34.100180.002341> **34**, 465–496 (2003).
17. Bennett, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* **153**, S347–S357 (2008).

18. San Millan, A. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends Microbiol* **26**, 978–985 (2018).
19. Silver, S. & Misra, T. K. Plasmid-Mediated Heavy Metal Resistances. *Annu Rev Microbiol* **42**, 717–743 (1988).
20. Mercado-Blanco, J. & Toro, N. Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**, 535–545 (1996).
21. Rankin, D. J., Rocha, E. P. C. & Brown, S. P. What traits are carried on mobile genetic elements, and why? *Heredity (Edinb)* **106**, 1–10 (2011).
22. Schneider, C. L. Bacteriophage-Mediated Horizontal Gene Transfer: Transduction. in *Bacteriophages* 151–192 (Springer International Publishing, 2021). doi:10.1007/978-3-319-41986-2\_4.
23. Quiles-Puchalt, N., Martínez-Rubio, R., Ram, G., Lasa, I. & Penadés, J. R. Unravelling bacteriophage  $\phi$ 11 requirements for packaging and transfer of mobile genetic elements in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **91**, 423–437 (2014).
24. von Wintersdorff, C. J. H. *et al.* Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front Microbiol* **7**, 173 (2016).
25. 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).
26. Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S. & Lesterlin, C. Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes (Basel)* **11**, 1239 (2020).
27. de La Cruz, F., Frost, L. S., Meyer, R. J. & Zechner, E. L. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 18–40 (2010).
28. Guglielmini, J., de la Cruz, F. & Rocha, E. P. C. Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems. *Mol Biol Evol* **30**, 315–331 (2013).
29. Ares-Arroyo, M., Coluzzi, C. & Rocha, E. P. C. Towards solving the conundrum of plasmid mobility: networks of functional dependencies shape plasmid transfer. *bioRxiv* 2022.07.04.498229 (2022) doi:10.1101/2022.07.04.498229.
30. O'Brien, F. G. *et al.* Origin-of-transfer sequences facilitate mobilisation of non-conjugative antimicrobial-resistance plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* **43**, 7971–7983 (2015).
31. San Millan, A. & MacLean, R. C. Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).
32. Baltrus, D. A. Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends Ecol Evol* **28**, 489–495 (2013).
33. San Millan, A. *et al.* Integrative analysis of fitness and metabolic effects of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *The ISME Journal* 2018 12:12 **12**, 3014–3024 (2018).
34. 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).

35. 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).
36. Baharoglu, Z. & Mazel, D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 1126–1145 (2014).
37. 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 (1985).
38. 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).
39. Fernandez-Lopez, R. & Cruz, F. de la. Rebooting the genome: The role of negative feedback in horizontal gene transfer. <http://dx.doi.org/10.4161/2159256X.2014.988069> **4**, 1–6 (2015).
40. 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**, 6611–6621 (2006).
41. 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).
42. Ilangovan, A., Connery, S. & Waksman, G. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends Microbiol* **23**, 301–310 (2015).
43. Turner, P. E., Cooper, V. S. & Lenski, R. E. Tradeoff between horizontal and vertical modes of vertical transmission in bacterial plasmids. *Evolution (N Y)* **52**, 315–329 (1998).
44. Caro, L. G. & Schnös, M. The attachment of the male-specific bacteriophage F1 to sensitive strains of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 126–132 (1966).
45. Novotny, C., Knight, W. S. & Brinton, C. C. Inhibition of Bacterial Conjugation by Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid Male-Specific Bacteriophages. *J Bacteriol* **95**, 314–326 (1968).
46. Rocha, E. P. C. & Danchin, A. Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends in Genetics* **18**, 291–294 (2002).
47. Nishida, H. Comparative Analyses of Base Compositions, DNA Sizes, and Dinucleotide Frequency Profiles in Archaeal and Bacterial Chromosomes and Plasmids. *Int J Evol Biol* **2012**, 1–5 (2012).
48. Raghavan, R., Kelkar, Y. D. & Ochman, H. A selective force favoring increased G+C content in bacterial genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 14504–14507 (2012).
49. Dietel, A.-K., Merker, H., Kaltenpoth, M. & Kostid, C. Selective advantages favour high genomic AT-contents in intracellular elements. *PLoS Genet* **15**, (2019).

50. Millan, A. S., Toll-Riera, M., Qi, Q. & MacLean, R. C. Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* **6**, 6845 (2015).
51. Ingmer, H., Miller, C. & Cohen, S. N. The RepA protein of plasmid pSC101 controls *Escherichia coli* cell division through the SOS response. *Mol Microbiol* **42**, 519–526 (2001).
52. Johnson, C. M. & Grossman, A. D. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018> **49**, 577–601 (2015).
53. Dimopoulou, I. D., Russell, J. E., Mohd-Zain, Z., Herbert, R. & Crook, D. W. Site-Specific Recombination with the Chromosomal tRNA<sup>Leu</sup> Gene by the Large Conjugative Haemophilus Resistance Plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1602 (2002).
54. Roberts, A. P. & Mullany, P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol* **17**, 251–258 (2009).
55. Rodríguez-Beltrán, J. *et al.* Translational demand is not a major source of plasmid-associated fitness costs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **377**, (2022).
56. Acar Kirit, H., Lagator, M. & Bollback, J. P. Experimental determination of evolutionary barriers to horizontal gene transfer. *BMC Microbiol* **20**, 1–13 (2020).
57. Hernández-Arriaga, A. M., Chan, W. T., Espinosa, M. & Díaz-Orejas, R. Conditional Activation of Toxin-Antitoxin Systems: Postsegregational Killing and Beyond. *Microbiol Spectr* **2**, (2014).
58. San Millan, J. L., Hernandez-Chico, C., Pereda, P. & Moreno, F. Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin B17 production and immunity. *J Bacteriol* **163**, 275–281 (1985).
59. Cohen, O., Gophna, U. & Pupko, T. The Complexity Hypothesis Revisited: Connectivity Rather Than Function Constitutes a Barrier to Horizontal Gene Transfer. *Mol Biol Evol* **28**, 1481–1489 (2011).
60. Loftie-Eaton, W. *et al.* Evolutionary Paths That Expand Plasmid Host-Range: Implications for Spread of Antibiotic Resistance. *Mol Biol Evol* **33**, 885–897 (2016).
61. 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).
62. San Millan, A., Heilbron, K. & MacLean, R. C. Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. *ISME Journal* **8**, 601–612 (2014).
63. Gama, J. A., Zilhão, R. & Dionisio, F. Plasmid Interactions Can Improve Plasmid Persistence in Bacterial Populations. *Front Microbiol* **11**, 2033 (2020).
64. Sagai, H., Iyobe, S. & Mitsuhashi, S. Inhibition and facilitation of transfer among *Pseudomonas aeruginosa* R plasmids. *J Bacteriol* **131**, 765–769 (1977).

65. Gama, J. A., Zilhão, R. & Dionisio, F. Impact of plasmid interactions with the chromosome and other plasmids on the spread of antibiotic resistance. *Plasmid* **99**, 82–88 (2018).
66. MacLean, R. C. & San Millan, A. Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox. *Current Biology* **25**, R764–R767 (2015).
67. Brockhurst, M. A. & Harrison, E. Ecological and evolutionary solutions to the plasmid paradox. *Trends Microbiol* **30**, 534–543 (2022).
68. Bergstrom, C. T., Lipsitch, M. & Levin, B. R. Natural Selection, Infectious Transfer and the Existence Conditions for Bacterial Plasmids. *Genetics* **155**, 1505–1519 (2000).
69. Stewart, F. M. & Levin, B. R. The Population Biology of Bacterial Plasmids: A PRIORI Conditions for the Existence of Conjugationally Transmitted Factors. *Genetics* **87**, 209–228 (1977).
70. Lundquist, P. D. & Levin, B. R. TRANSITORY DEREPRESSION AND THE MAINTENANCE OF CONJUGATIVE PLASMIDS. *Genetics* **113**, 483–497 (1986).
71. Zwanzig, M. *et al.* Mobile Compensatory Mutations Promote Plasmid Survival. *mSystems* **4**, (2019).
72. DelaFuente, J. *et al.* Within-patient evolution of plasmid-mediated antimicrobial resistance. *Nat Ecol Evol* **6**, 1980–1991 (2022).
73. Carrilero, L. *et al.* Positive Selection Inhibits Plasmid Coexistence in Bacterial Genomes. doi:10.1128/mBio.00558-21.
74. Millan, A. S. *et al.* Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nat Commun* **5**, 5208 (2014).
75. 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 (United Kingdom)* **166**, 56–62 (2020).
76. 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).
77. Lopatkin, A. J. *et al.* Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nature Communications* **2017 8:1** **8**, 1–10 (2017).
78. Hall, J. P. J., Wood, A. J., Harrison, E. & Brockhurst, M. A. Source-sink plasmid transfer dynamics maintain gene mobility in soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 8260–8265 (2016).
79. Dionisio, F., Conceiçã, I. C., Marques, A. C. R., Fernandes, L. & Gordo, I. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biol. Lett* **1**, 250–252 (2005).
80. Loftie-Eaton, W. *et al.* Compensatory mutations improve general permissiveness to antibiotic resistance plasmids. *Nat Ecol Evol* **1**, 1354–1363 (2017).

81. 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 (N Y)* **153**, 452–463 (2007).
82. Gama, J. A., Kloos, J., Johnsen, P. J. & Samuelsen, Ø. Host dependent maintenance of a blaNDM-1-encoding plasmid in clinical Escherichia coli isolates. *Scientific Reports* **2020 10:1** **10**, 1–7 (2020).
83. di Luca, M. C. *et al.* Low biological cost of carbapenemase-encoding plasmids following transfer from Klebsiella pneumoniae to Escherichia coli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **72**, 85–89 (2017).
84. Hall, J. P. J. *et al.* Environmentally co-occurring mercury resistance plasmids are genetically and phenotypically diverse and confer variable context-dependent fitness effects. *Environ Microbiol* **17**, 5008–5022 (2015).
85. Humphrey, B. *et al.* Fitness of Escherichia coli strains carrying expressed and partially silent IncN and IncP1 plasmids. *BMC Microbiol* **12**, 1–9 (2012).
86. 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).
87. Li, L. *et al.* Plasmids persist in a microbial community by providing fitness benefit to multiple phylotypes. *ISME J* **14**, 1170–1181 (2020).
88. Resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
89. Factsheet for experts - Antimicrobial resistance. <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/facts/factsheets/experts>.
90. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **399**, 629–655 (2022).
91. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* **128**, 1037–1050 (2007).
92. Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology* **303**, 298–304 (2013).
93. Nikaido, H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem* **78**, 119–146 (2009).
94. Zapun, A., Contreras-Martel, C. & Vernet, T. Penicillin-binding proteins and b-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 361–385 (2008).
95. Kitano, K. & Tomasz, A. Triggering of autolytic cell wall degradation in Escherichia coli by beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **16**, 838–848 (1979).
96. Campos, J. *et al.* Surveillance of outpatient antibiotic consumption in Spain according to sales data and reimbursement data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**, 698–701 (2007).
97. Grau, S. *et al.* Antimicrobial consumption among 66 acute care hospitals in catalonia: Impact of the covid-19 pandemic. *Antibiotics* **10**, (2021).

98. Suárez, C. & Gudiol, F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **27**, 116–129 (2009).
99. Gómez, J., García-Vázquez, E. & Hernández-Torres, A. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter* **28**, 1–9 (2015).
100. Delcour, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1794**, 808–816 (2009).
101. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**, 20–51 (2005).
102. Malouin, F. & Bryan, L. E. MINIREVIEWS Modification of Penicillin-Binding Proteins as Mechanisms of r-Lactam Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 1–5 (1986).
103. Wilke, M. S., Lovering, A. L. & Strynadka, N. C. J.  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* **8**, 525–533 (2005).
104. Rice, L. B. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to  $\beta$ -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Medical Education and Research Mayo Clin Proc* **87**, 198–208 (2012).
105. Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**, 321–331 (1980).
106. Bush, K. & Jacoby, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 969–976 (2010).
107. Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev* **18**, 657–686 (2005).
108. Cantón, R. & Coque, T. M. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **9**, 466–475 (2006).
109. Queenan, A. M. & Bush, K. Carbapenemases: the Versatile-Lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**, 440–458 (2007).
110. Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F. *The Prokaryotes. The Prokaryotes: Gammaproteobacteria* (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-38922-1.
111. Jandhyala, S. M. *et al.* role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **21**, 8787–8803 (2015).
112. Gutiérrez Saborido, D., Pérez Guerrero, P., Ruiz Blasco, E. & Ríos Holgado, I. M. Formas clínicas de infecciones por enterobacterias. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, ISSN 0304-5412, Serie 11, N°. 55, 2014 (Ejemplar dedicado a: Enfermedades infecciosas (VII): Infecciones por anaerobios y enterobacterias), págs. 3283-3290* **11**, 3283–3290 (2014).
113. Vincent, J. L. *et al.* International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA* **302**, 2323–2329 (2009).
114. Ecdc. Antimicrobial resistance surveillance in Europe, 2022 - 2020 data.

115. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:2 **2**, 123–140 (2004).
116. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI. *Nat Rev Microbiol* **2**, 3 (2004).
117. Pitout, J. D. D. & Finn, T. J. The evolutionary puzzle of Escherichia coli ST131. *Infection, Genetics and Evolution* **81**, 104265 (2020).
118. Carattoli, A. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2227–2238 (2009).
119. Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D. & Carattoli, A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**, 2518–2529 (2010).
120. Coque, T. M. *et al.* Dissemination of Clonally Related Escherichia coli Strains Expressing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-15 - Volume 14, Number 2—February 2008 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg Infect Dis* **14**, 195–200 (2008).
121. Morris, D. *et al.* Detection of OXA-48 Carbapenemase in the Pandemic Clone Escherichia coli O25b:H4-ST131 in the Course of Investigation of an Outbreak of OXA-48-Producing Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 4030–4031 (2012).
122. D'Andrea, M. M. *et al.* Persistent Carriage and Infection by Multidrug-Resistant Escherichia coli ST405 Producing NDM-1 Carbapenemase: Report on the First Italian Cases. *J Clin Microbiol* **49**, 2755 (2011).
123. Peirano, G. *et al.* Global Incidence of Carbapenemase-Producing Escherichia coli ST131 - Volume 20, Number 11—November 2014 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg Infect Dis* **20**, 1928–1931 (2014).
124. Podschun, R. & Ullmann, U. Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **11**, 589–603 (1998).
125. Podschun, R. & Ullmann, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* **11**, 589–603 (1998).
126. Mathers, A. J., Peirano, G. & Pitout, J. D. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* **28**, 565–591 (2015).
127. Peirano, G., Chen, L., Kreiswirth, B. N. & Pitout, J. D. D. Emerging antimicrobial-resistant high-risk klebsiella pneumoniae clones ST307 and ST147. *Antimicrob Agents Chemother* **64**, (2020).
128. Branas, P. *et al.* Molecular epidemiology of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *Int J Antimicrob Agents* **46**, 111–116 (2015).

129. Oteo, J. *et al.* Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 3406–3412 (2015).
130. de Toro, M. *et al.* Whole genome sequencing, molecular typing and in vivo virulence of OXA-48-producing *Escherichia coli* isolates including ST131 H30-Rx, H22 and H41 subclones OPEN. doi:10.1038/s41598-017-12015-0.
131. 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).
132. Poirel, L., Bonnin, R. A. & Nordmann, P. Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 559 (2012).
133. Potron, A., Nordmann, P., Rondinaud, E., Jauregui, F. & Poirel, L. A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: towards pan-resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**, 476–477 (2013).
134. Sattler, J. *et al.* Emergence of Tn 1999.7, a New Transposon in blaOXA-48-Harboring Plasmids Associated with Increased Plasmid Stability. *Antimicrob Agents Chemother* **66**, (2022).
135. Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K. A. & Matsumura, Y. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. *Clin Microbiol Rev* **33**, (2020).
136. León-Sampedro, R. *et al.* Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nature Microbiology* **2021 6:5 6**, 606–616 (2021).
137. 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).
138. Lázaro-Perona, F. *et al.* Dissemination of a single ST11 clone of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* within a large polyclonal hospital outbreak determined by genomic sequencing. *Microb Genom* **8**, 808 (2022).
139. 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 (2019).
140. Antibiotic resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
141. 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).

142. Maechler, F. *et al.* Contact isolation versus standard precautions to decrease acquisition of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales in non-critical care wards: a cluster-randomised crossover trial. *Lancet Infect Dis* **20**, 575–584 (2020).
143. le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D. & Mazel, D. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* **73**, 777–784 (2007).
144. Maiden, M. C. J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**, 561–588 (2006).
145. 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 (2016).
146. Strand, T. A., Lale, R., Degnes, K. F., Lando, M. & Valla, S. A New and Improved Host-Independent Plasmid System for RK2-Based Conjugal Transfer. *PLoS One* **9**, e90372 (2014).
147. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640–6645 (2000).
148. Lenski, R. E., Rose, M. R., Simpson, S. C. & Tadler, S. C. *Long-Term Experimental Evolution in Escherichia coli. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations.* Source: *The American Naturalist* vol. 138 (1991).
149. 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).
150. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114 (2014).
151. Bankevich, A. *et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* **19**, 455–477 (2012).
152. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **29**, 1072 (2013).
153. Seemann, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**, 2068–2069 (2014).
154. 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).
155. Zankari, E. *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**, 2640–2644 (2012).
156. Ondov, B. D. *et al.* Mash: Fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol* **17**, 1–14 (2016).
157. Katz, L. S. *et al.* Mashtree: a rapid comparison of whole genome sequence files. *J Open Source Softw* **4**, 1762 (2019).

158. 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).
159. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* **39**, W475–W478 (2011).
160. Lanza, V. F., Baquero, F., de La Cruz, F. & Coque, T. M. AcCNET (Accessory Genome Constellation Network): comparative genomics software for accessory genome analysis using bipartite networks. *Bioinformatics* **33**, 283–285 (2017).
161. Keck, F., Rimet, F., Bouchez, A. & Franc, A. phylosignal: an R package to measure, test, and explore the phylogenetic signal. *Ecol Evol* **6**, 2774–2780 (2016).
162. Blomberg, S. P., Garland, T. & Ives, A. R. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* **57**, 717–745 (2003).
163. Münkemüller, T. *et al.* How to measure and test phylogenetic signal. *Methods Ecol Evol* **3**, 743–756 (2012).
164. Anselin, L. Local Indicators of Spatial Association—LISA. *Geogr Anal* **27**, 93–115 (1995).
165. Lê, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* **25**, 1–18 (2008).
166. San Millán, Á. *et al.* A Metropolis-Hastings MCMC implementation used to fit a bacterial growth curve. *figshare. Software* (2014)  
doi:<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.1127995.v3>.
167. Lele, S. R., Nadeem, K. & Schmuland, B. Estimability and Likelihood Inference for Generalized Linear Mixed Models Using Data Cloning. *J Am Stat Assoc* **105**, 1617–1625 (2010).
168. Lele, S. R., Dennis, B. & Lutscher, F. Data cloning: easy maximum likelihood estimation for complex ecological models using Bayesian Markov chain Monte Carlo methods. *Ecol Lett* **10**, 551–563 (2007).
169. Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* **2008** 3:2 **3**, 163–175 (2008).
170. Agarwal, M., Rathore, R. S. & Chauhan, A. A Rapid and High Throughput MIC Determination Method to Screen Uranium Resistant Microorganisms. *Methods and Protocols* **2020**, Vol. 3, Page 21 **3**, 21 (2020).
171. Carlier, M., Verstraete, A. G., de Waele, J. J. & Stove, V. Stability of amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid reconstituted in isotonic saline. *Journal of Chemotherapy* **29**, 54–56 (2017).
172. Wang, H. *et al.* Increased plasmid copy number is essential for *Yersinia* T3SS function and virulence. *Science* **353**, 492–495 (2016).
173. Pena-Gonzalez, A. *et al.* Genomic Characterization and Copy Number Variation of *Bacillus anthracis* Plasmids pXO1 and pXO2 in a Historical Collection of 412 Strains. *mSystems* **3**, 65–83 (2018).

174. Jangir, P. K. *et al.* Pre-existing chromosomal polymorphisms in pathogenic *E. coli* potentiate the evolution of resistance to a last-resort antibiotic. *Elife* **11**, (2022).
175. Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. (2013).
176. Danecek, P. *et al.* Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience* **10**, 1–4 (2021).
177. 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).
178. David, S. *et al.* Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol* **4**, 1919–1929 (2019).
179. Bouma, J. E. & Lenski, R. E. Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature* **335**, 351–352 (1988).
180. Karanika, S., Karantanos, T., Arvanitis, M., Grigoras, C. & Mylonakis, E. Fecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase–Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases* **63**, 310–318 (2016).
181. Holt, K. E. *et al.* Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E3574–E3581 (2015).
182. Lili, L. N., Britton, N. F. & Feil, E. J. The Persistence of Parasitic Plasmids. *Genetics* **177**, 399–405 (2007).
183. Ponciano, J. M., de Gelder, L., Top, E. M. & Joyce, P. The Population Biology of Bacterial Plasmids: A Hidden Markov Model Approach. *Genetics* **176**, 957–968 (2007).
184. Cooper, N. S., Brown, M. E. & Caulcott, C. A. A mathematical method for analysing plasmid stability in micro-organisms. *J Gen Microbiol* **133**, 1871–1880 (1987).
185. Paulsson, J. & Ehrenberg, M. Noise in a minimal regulatory network: plasmid copy number control. *Q Rev Biophys* **34**, 1–59 (2001).
186. Simonsen, L., Gordon, D. M., Stewart, F. M. & Levin, B. R. Estimating the rate of plasmid transfer: An end-point method. *J Gen Microbiol* **136**, 2319–2325 (1990).
187. Alonso-del Valle, A. *et al.* Variability of plasmid fitness effects contributes to plasmid persistence in bacterial communities. *Nature Communications* **2021 12:1** **12**, 1–14 (2021).
188. Gogarten, J. P. & Townsend, J. P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**, 679 (2005).
189. Bethke, J. H. *et al.* Vertical and horizontal gene transfer tradeoffs direct plasmid fitness. *Mol Syst Biol* e11300 (2022) doi:10.15252/msb.202211300.
190. Benz, F. & Hall, A. R. Host-specific plasmid evolution explains the variable spread of clinical antibiotic-resistance plasmids. *bioRxiv* (2022) doi:10.1101/2022.07.06.498992.
191. Hernández-Beltrán, J. C. R., San Millán, A., Fuentes-Hernández, A. & Peña-Miller, R. Mathematical Models of Plasmid Population Dynamics. *Front Microbiol* **12**, 3389 (2021).

192. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **31**, (2018).
193. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
194. 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).
195. Roer, L., Aarestrup, F. M. & Hasman, H. The EcoKI type I restriction-modification system in *Escherichia coli* affects but is not an absolute barrier for conjugation. *J Bacteriol* **197**, 337–342 (2015).
196. Li, D. *et al.* Transmission barrier of the blaKPC plasmid mediated by type I restriction-modification systems in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **77**, 952–956 (2022).
197. Santos-López, A., Rodríguez-Beltrán, J. & Millán, A. L. S. The bacterial capsule is a gatekeeper for mobile DNA. *PLoS Biol* **19**, e3001308 (2021).
198. Dionisio, F., Zilhão, R. & Gama, J. A. Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid* **102**, 29–36 (2019).
199. Svara, F. & Rankin, D. J. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. *BMC Evol Biol* **11**, 1–10 (2011).
200. Martín-Aragón Álvarez, S. Tratamiento de las infecciones de las vías respiratorias altas. *Offarm* **29**, 92–97 (2010).
201. ★ Medicación de infecciones de vías respiratorias superiores. [https://www.vademecum.es/enfermedad-infecciones+de+vias+respiratorias+superiores\\_1321\\_1](https://www.vademecum.es/enfermedad-infecciones+de+vias+respiratorias+superiores_1321_1).
202. Crader, M. F. & Varacallo, M. *Preoperative Antibiotic Prophylaxis*. StatPearls (StatPearls Publishing, 2022).
203. Charlo Molina, T., Valderrábanos, E. S., Goicochea Valdivia, W. A. & Neth, O. Profilaxis antibiótica perioperatoria UCIP Hospital Infantil Virgen del Rocío. Sevilla. *Protoc diagn ter pediatr* **1**, 501–517 (2021).
204. Shankar, C. *et al.* Distinctive Mobile Genetic Elements Observed in the Clonal Expansion of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in India. *Microbial Drug Resistance* **27**, 1096–1104 (2021).
205. Aires-De-Sousa, M. *et al.* Epidemiology of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Hospital, Portugal. *Emerg Infect Dis* **25**, 1632 (2019).
206. Oteo, J. *et al.* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 6344 (2013).
207. Paño-Pardo, J. R. *et al.* Community-Onset Bloodstream and Other Infections, Caused by Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae: Epidemiological, Microbiological, and Clinical Features. *Open Forum Infect Dis* **3**, (2016).

208. Zurfluh, K. *et al.* Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48  $\beta$ -lactamase in the community in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control* **4**, 1–3 (2015).
209. Gurung, S. *et al.* Detection of OXA-48 Gene in Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Urine Samples. *Infect Drug Resist* **Volume 13**, 2311–2321 (2020).
210. Acman, M., van Dorp, L., Santini, J. M. & Balloux, F. Large-scale network analysis captures biological features of bacterial plasmids. *Nature Communications* **2020 11:1** **11**, 1–11 (2020).
211. Almeida, A. *et al.* A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* **2019 568:7753** **568**, 499–504 (2019).
212. Martinson, J. N. V. *et al.* Rethinking gut microbiome residency and the Enterobacteriaceae in healthy human adults. *The ISME Journal* **2019 13:9** **13**, 2306–2318 (2019).
213. van de Wiele, T., van den Abbeele, P., Ossieur, W., Possemiers, S. & Marzorati, M. The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). in *The Impact of Food Bioactives on Health* 305–317 (2015).

## ANEXO



## ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22849-y>

OPEN

# Variability of plasmid fitness effects contributes to plasmid persistence in bacterial communities

Aida Alonso-del Valle<sup>1</sup>, Ricardo León-Sampedro<sup>1,2</sup>, Jerónimo Rodríguez-Beltrán<sup>1,2</sup>, Javier De la Fuente<sup>1</sup>, Marta Hernández-García<sup>1,3</sup>, Patricia Ruiz-Garrajosa<sup>1,3</sup>, Rafael Cantón<sup>1,3</sup>, Rafael Peña-Miller<sup>4</sup>✉ & Alvaro San Millán<sup>1,2,5</sup>✉

Plasmid persistence in bacterial populations is strongly influenced by the fitness effects associated with plasmid carriage. However, plasmid fitness effects in wild-type bacterial hosts remain largely unexplored. In this study, we determined the fitness effects of the major antibiotic resistance plasmid pOXA-48\_K8 in wild-type, ecologically compatible enterobacterial isolates from the human gut microbiota. Our results show that although pOXA-48\_K8 produced an overall reduction in bacterial fitness, it produced small effects in most bacterial hosts, and even beneficial effects in several isolates. Moreover, genomic results showed a link between pOXA-48\_K8 fitness effects and bacterial phylogeny, helping to explain plasmid epidemiology. Incorporating our fitness results into a simple population dynamics model revealed a new set of conditions for plasmid stability in bacterial communities, with plasmid persistence increasing with bacterial diversity and becoming less dependent on conjugation. These results help to explain the high prevalence of plasmids in the greatly diverse natural microbial communities.

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Centro de Investigación Biológica en Red, Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. <sup>4</sup>Center for Genomic Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico. <sup>5</sup>Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid, Spain. ✉email: [rafael.penamiller@gmail.com](mailto:rafael.penamiller@gmail.com); [alvasanmillan@gmail.com](mailto:alvasanmillan@gmail.com)