



Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Beatriz Herrera Conejero

Directores

Carles Úbeda Morant

Fernando González Candelas

Tutor

José García Martínez

Abril, 2021

A mis tres soles,

“La vida es de por sí bastante interesante. A un niño de siete años puede emocionarle que Perico, al abrir la puerta, se encuentre con un dragón; pero a un niño de tres años le emociona ya bastante que Perico abra la puerta.”

G. K. CHESTERTON

Ojalá pueda transmitir el asombro de la vida.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis Carles y Fernando por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo tan multidisciplinar. A Carles, por todo lo aprendido no solo a nivel experimental sino también por enseñarme la importancia de comunicar correctamente los resultados. Por las correcciones, siempre amables y educadas. Por estar siempre disponible y por predicar con el ejemplo, trabajando como el que más. Por apostar por mí incluso antes de haber empezado el Máster. Probablemente no he llegado a cubrir las expectativas, pero he intentado hacer siempre todo lo mejor que he podido. A Fernando, por acercarme a un mundo totalmente desconocido para mí y hacerme un hueco en su equipo de trabajo. Tampoco querría olvidarme del Dr. Soren, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y aprender, a pesar de los imprevistos, la verdadera citometría. A todo su equipo en especial a Rafa, por hacerme la estancia más familiar y a Asmus por el tiempo y esfuerzo invertido con nuestras muestras.

También quería agradecer a todos los que han colaborado de alguna forma en este trabajo, que no son pocos. De forma especial a Neris por su paciencia y porque sin ella hubiesen sido imposibles parte de los resultados de esta tesis. También a Iván por su visión experta sobre la resistencia a antibióticos que llegó en un momento clave para no desesperarme buscando genes en tablas interminables como si de una aguja en un pajar se tratase. Por otro lado, quiero agradecer a todos los que han “sufrido” mis ausencias viendo incrementada su carga de trabajo, y a los que de una forma u otra han compartido proyecto conmigo: Majo, Anna, Iván, este logro es también vuestro. A Conxa, por tenerlo todo siempre controlado. Al personal de la unidad de citometría (tanto de La Fe como de la UV) y del animalario. Especialmente a Inma Ballester, por ser tan comprensiva con los cambios de última hora, por enseñarme las técnicas con paciencia y estar siempre dispuesta a ayudarnos con los experimentos.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a mis compañeros de laboratorio, por hacer que todo sea tan fácil y crear un ambiente estupendo. A las que ya no están pero que tanto me han enseñado, Ana y Sandrine, dejasteis el listón muy alto. A Alejandra,

mi compañera de batallas, que tantas veces me puso los cultivos a crecer para que no se me hicieran las tantas con las transformaciones. A Anna, la revolución, viviste mi mejor momento en el animalario, pero el discípulo superó al maestro. A Majo, por tus consejos, por resolver los misterios de transformación de FISABIO, y por esas reuniones interminables. A Iván, que nunca dice No, gracias por tanto trabajo que muchas veces parece que queda en las sombras, tu ayuda es impagable. A Gara, que supo hacerse un hueco a pesar de ser poco tiempo, en nuestra familia tienes también otro. Y a todos los compis de sala que han hecho que este tiempo hay sido inolvidable. En especial a Carlos por tantas veces que he interrumpido tu trabajo y me has ayudado a salir de mis atascos bioinformáticos.

En tercer lugar, quería agradecer a mis amigos, los de toda la vida, los que más que amigos son hermanos, los de la carrera, por estar siempre pendientes, animarme y soportarme (= dar soporte). Y a mi familia sin la que esto, realmente habría sido imposible.

A mis padres, no solo por el esfuerzo invertido y por la educación recibida de niña sino porque sin su presencia y ayuda del día a día actual no habría podido terminar esta tesis. Y especialmente a Marcos, por apoyarme siempre, pase lo que pase. Por aportar el toque estético a este trabajo. Por cargar tú con todo para que yo avanzara más rápido, por compartir conmigo las noches sin dormir, las penas, las alegrías... en definitiva, por haber compartido no solo esta aventura sino la vida entera. Porque nuestra familia es preciosa, pero todo, solo y siempre tú, lo haces posible.

Síntesis

La multirresistencia a antibióticos en patógenos bacterianos, incluyendo enterobacterias y enterococo, está catalogada por la OMS como uno de los 3 principales problemas de salud a nivel mundial del siglo XXI. La adquisición de nuevas resistencias está altamente relacionada con la diseminación de plásmidos conjugativos y otros elementos genéticos móviles (EGM) que codifican genes que confieren resistencia a antibióticos. Las características específicas del ambiente intestinal, entre las que destaca la elevada densidad bacteriana que permite el contacto directo entre bacterias filogenéticamente alejadas, convierten al intestino en un nicho muy favorable para la diseminación de EGM y por tanto para la generación de nuevas cepas multirresistentes. No obstante, debido a las restricciones que han supuesto durante años el cultivo bacteriano y el trabajo en ambientes anaeróbicos, todavía se desconocen muchos aspectos acerca de los factores que promueven diseminación de EGM en el intestino, así como las bacterias capaces de adquirir y transferir dichos EGM. Un estudio reciente utilizaba plásmidos codificantes para la proteína GFP con el objetivo de detectar mediante citometría de flujo e identificar mediante secuenciación del gen 16S rRNA aquellas bacterias del suelo que hubiesen adquirido dichos plásmidos, evitando así recurrir al cultivo bacteriano. Sin embargo, el requerimiento de oxígeno para el correcto plegamiento y la emisión de fluorescencia de la proteína GFP impiden el uso de esta metodología para el estudio de transferencia de EGM en el ambiente intestinal. En este trabajo, tratamos de desarrollar un herramienta con proteínas fluorescentes en condiciones anaeróbicas o tras una corta exposición al oxígeno que nos permitieran analizar la TGH de plásmidos conjugativos presentes en enterobacterias a otras bacterias de la microbiota intestinal en condiciones de anaerobiosis.

De manera complementaria, hemos estudiado mediante secuenciación genómica eventos de TGH en pacientes hospitalizados con leucemia aguda colonizados con enterobacterias multirresistentes, así como posibles mecanismos que permiten a las enterobacterias adquirir resistencia a nuevos antibióticos. Para terminar, se estudió el efecto de la dieta occidental (DO) como potenciador de la colonización intestinal por patógenos multirresistentes que frecuentemente presentan genes de resistencia codificados en EGM y cuya colonización intestinal podría favorecer la diseminación de dichos genes a otros miembros de la microbiota intestinal.

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

Los resultados obtenidos muestran que los plásmidos conjugativos testados (R388, RP4) son capaces de transferirse desde la bacteria donadora (*E. coli*) a bacterias de distintos filos de la microbiota humana y del ratón, incluyendo los filos Firmicutes y Bacteroidetes. Dentro de éstos, los géneros que adquirieron con una mayor eficiencia los plásmidos conjugativos encontramos *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, que incluyen bacterias que suelen causar infecciones graves en humanos lo que implica que estas bacterias tienen facilidad para adquirir por conjugación genes de resistencia a antibióticos que pueden dificultar su tratamiento. Por otro lado, también vemos transferencia a bacterias comensales, principalmente a *Bacteroides*, que por tanto podrían actuar como reservorio de estas multirresistencias y transferirlas posteriormente a otros patógenos que colonizasen el intestino. Estos resultados fueron obtenidos con un modelo *ex vivo*. Sin embargo, también hemos puesto a punto un modelo *in vivo*, utilizando ratones, que nos ha permitido identificar diseminación de plásmidos conjugativos, utilizando el sistema de fluorescencia, en el intestino del ratón.

Los resultados obtenidos con los aislados clínicos de enterobacterias multirresistentes también revelan una alta frecuencia de TGH en la microbiota intestinal de pacientes con leucemia aguda, así como la existencia de mutaciones puntuales en genes relacionados con la resistencia a antibióticos, como la proteína BamA, que podrían explicar la adquisición de nuevas resistencias en enterobacterias.

Por último, experimentos realizados con el modelo de ratón demuestran que el consumo de dieta occidental (alta en grasa y azúcares simples) induce cambios en la microbiota intestinal, algunos de ellos permanentes, que permiten que el patógeno multirresistente enterococo vancomicina resistente colonice el intestino en ausencia de otros factores perturbadores de la microbiota tales como los antibióticos. Dentro de los cambios inducidos por la dieta occidental en la microbiota destaca la disminución de los niveles del género *Barnesiella*, un taxón potencialmente protector frente al enterococo vancomicina resistente.

Abreviaturas

AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
amp	Ampicilina
ANCOM	Análisis de la composición de microbiomas
ARIBA	Identificación de resistencias microbianas mediante ensamblado
ASV	Amplicons Sequence Variants – variantes de secuencia únicas
ATC	Anidrotetraciclina
BEA	Agar Bilis Esculina
BHI	Infusión Cerebro Corazón
cat	Gen de resistencia a cloranfenicol
CBA	Columbia Agar Sangre
cm	Cloranfenicol
DC	Dieta control
DO	Dieta Occidental
EARS-Net	Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos
EGM	Elemento genético móvil
EMR	Enterobacterias multirresistentes
FbFP	Proteínas fluorescentes basadas en el mononucleótido de flavina
FSC	Forward scatter – dispersión frontal
FSC-A	Área de FSC
FSC-H	Altura de FSC
GF	Germ Free, libre de bacterias (sin microbiota)
GFP	Proteína verde fluorescente
GRAs	Genes de resistencia a antibióticos
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kan	Kanamicina
LB	Luria Bertani
MDR	Bacterias multirresistentes
Msec	Millones de secuencias
MLST	Tipado Multilocus de Secuencia
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>o.n.</i>	<i>Overnight</i> – durante toda la noche
ORFs	Marcos abiertos de lectura
OTU	Unidad taxonómica operacional
PBS	Tampón fosfato salino
PBScys	PBS con cisteína
PCoA	Análisis de Coordenadas Principales
rpm	Revoluciones por minuto
S.O.C.	Medio de cultivo super óptimo con glucosa
SEM	Error estándar de la media

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

sfGFP	Proteína superfolder (superplegamiento)-GFP
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido
SSC-A	Side scatter – dispersión lateral
ST	Secuenciotipo
stp	Estreptomicina
stp^R	Resistente a estreptomicina
TC	Transconjugantes
TF	Trasplante fecal
TFH	TF con microbiota humana
TFR	TF con microbiota de ratón
TGH	Transferencia Genética Horizontal
T4SS	Sistema de secreción tipo IV
UFCs	Unidades Formadoras de Colonias
VRE	Enterococo resistente a vancomicina

Resumen

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a antibióticos es la habilidad de un microorganismo de resistir la acción de uno o más agentes antimicrobianos y está considerada como una de las tres amenazas más importantes de la salud pública del siglo XXI ya que cada vez existen menos antibióticos disponibles para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias resistentes, lo que se convierte en un serio peligro para la vida del paciente (1). En este estudio nos centraremos en las enterobacterias multirresistentes (incluyendo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* entre otras) y los enterococos resistentes a vancomicina (VRE), patógenos oportunistas que se encuentran entre las bacterias que suponen un mayor riesgo a nivel global. Estos patógenos inician su infección generalmente mediante la colonización del tracto intestinal, desde donde pueden llegar a la sangre y diseminarse a otros órganos provocando infecciones graves que pueden incluso acabar con la vida del paciente, así como transferirse a otros pacientes a través de contaminación fecal en ambientes hospitalarios (2,3).

La diseminación de elementos genéticos móviles (EGM), en concreto de plásmidos conjugativos conteniendo genes de resistencia a antibióticos, está considerada como uno de los principales mecanismos de generación de cepas multirresistentes, incluyendo en enterobacterias y enterococo. A pesar de que la transferencia genética horizontal (TGH) de plásmidos ha sido detectada en numerosos ambientes (i.e. aguas, suelo, ambientes hospitalarios, etc.) el tracto intestinal está considerado como un “punto caliente” para la TGH (4). La elevada densidad microbiana que favorece el contacto directo entre las células y la interacción entre bacterias filogenéticamente alejadas, sostenida por un flujo de nutrientes continuo convierte al intestino en un nicho muy favorable para la diseminación de EGM (5). A pesar de su importancia, se conoce poco acerca de los factores que podrían promover la diseminación de EGM en el intestino, así como de las bacterias que serían capaces de captar y transferir EGM, diseminar genes de resistencia y generar nuevos patógenos resistentes a antibióticos. Una de las causas por las cuales disponemos de información reducida sobre la diseminación de EGM en el intestino es debido a la falta de métodos para estudiar TGH en el ambiente anaeróbico intestinal. Recientemente, Klümper y colaboradores diseñaron una estrategia basada en la detección de fluorescencia

mediante citometría de flujo, separación celular y posterior identificación mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA que les permitió estudiar la diseminación de plásmidos conjugativos, modificados para expresar la proteína fluorescente GFP, en la microbiota de suelo (6). Esta metodología tiene la gran ventaja de que permite identificar las bacterias donde se diseminan los EGM sin necesidad de cultivarlas, de gran utilidad si queremos estudiar la diseminación de EGM en la microbiota intestinal ya que la mayoría de las bacterias de la microbiota son difíciles de crecer *in vitro*. Sin embargo, el requerimiento de oxígeno para el correcto plegamiento y emisión de fluorescencia por parte de la proteína GFP no hacen posible su utilización para el estudio de diseminación de EGM en ambientes anaeróbicos, como es el caso del intestino.

En respuesta a la necesidad de oxígeno de las proteínas GFP, se publicó en 2007 el descubrimiento de las llamadas proteínas fluorescentes basadas en el mononucleótido de flavina (proteínas FbFP) codificadas por el gen *ytvA* de *Bacillus subtilis*, cuya señal fluorescente es independiente de los niveles de oxígeno (7). Por otro lado, también recientemente ha sido publicada una proteína GFP modificada (superfolder GFP, sfGFP) que requiere únicamente una breve exposición a oxígeno para plegarse de manera correcta y poder emitir fluorescencia. Esta proteína fue utilizada con éxito para detectar bacterias anaeróbicas mediante fluorescencia (8). En la presente tesis doctoral se ha pretendido poner a punto una nueva herramienta para el estudio de diseminación de EGM en el ambiente anaeróbico intestinal, basada en la utilización de las citadas proteínas fluorescentes en condiciones de anaerobiosis. Las bacterias con plásmidos conjugativos que codifican proteínas fluorescentes serán detectadas y separadas por citometría de flujo, y posteriormente serán identificadas mediante la secuenciación masiva del gen 16S rRNA.

Otra técnica que se ha desarrollado en gran medida en los últimos años y que resulta de gran utilidad para el estudio de EGM es la secuenciación de los genomas completos bacterianos. En este trabajo se recurre a la secuenciación de enterobacterias multirresistentes aisladas de pacientes hospitalizados para el estudio de la evolución a corto plazo de estos patógenos *in vivo*, con especial hincapié en la

adquisición de resistencia a antibióticos mediante mecanismos tales como la adquisición de plásmidos conjugativos.

Los patógenos oportunistas, tales como las enterobacterias y el enterococo, en condiciones normales no son capaces de colonizar el intestino debido a la función protectora de la microbiota intestinal conocida como “resistencia a la colonización”. Sin embargo, algunos factores, principalmente los antibióticos, generan perturbaciones en la composición de la microbiota intestinal, proceso conocido con el nombre de “disbiosis”, que pueden resultar en una pérdida de la función protectora de la microbiota. Al desaparecer la resistencia a la colonización, patógenos oportunistas como enterococos o las enterobacterias son capaces de alcanzar niveles intestinales lo suficientemente elevados como para que se promueva su diseminación al torrente sanguíneo, desde donde pueden alcanzar diferentes órganos y suponer un verdadero problema para la vida del paciente (9). A parte de los tratamientos con antibiótico, otros factores tales como la inflamación o el tipo de dieta, pueden ocasionar cierto grado de disbiosis intestinal (10,11); sin embargo, en el caso de la dieta, se desconoce si esta disbiosis podría favorecer la colonización intestinal por patógenos, proceso al que intentaremos dar respuesta en este trabajo. Además, sabemos que la TGH está condicionada, entre otros factores, por la abundancia de las bacterias donadora y aceptora, por lo que, en caso de que la dieta promoviera la colonización intestinal por patógenos, los altos niveles alcanzados por estos en el intestino podrían favorecer a su vez la transmisión o adquisición de genes de resistencia a antibióticos a través de EGM. Siendo así, la microbiota podría jugar un importante papel como reservorio de genes de resistencia a antibióticos y un nicho de generación de nuevas cepas multirresistentes.

Con el objetivo principal de estudiar la diseminación de elementos genéticos móviles (EGM) en la microbiota intestinal y su efecto en la generación de cepas resistentes a antibióticos, se definieron 3 objetivos principales para nuestro proyecto:

Objetivo 1: Desarrollar una nueva metodología para estudiar la diseminación de EGM en la microbiota intestinal.

Objetivo 2: Estudiar la diseminación de EGM y adquisición de resistencias en pacientes mediante el análisis de genomas de aislados clínicos multirresistentes.

Objetivo 3: Estudio de factores externos (i.e. dieta occidental vs antibióticos) que puedan promover la colonización intestinal por patógenos, lo que podría facilitar la transmisión de EGM entre microbiota y el patógeno.

1. Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

Con el objetivo de estudiar TGH en el ambiente intestinal seguimos una estrategia de detección mediante citometría de flujo de plásmidos conjugativos naturales que confieren resistencia a múltiples antibióticos y que expresan un marcador fluorescente, basándonos en la metodología previamente utilizada por Klümper y colaboradores para estudiar TGH en bacterias del suelo (6). En esta estrategia, la célula donadora contiene, por un lado, el plásmido conjugativo con el marcador fluorescente controlado por un promotor de amplio espectro y, por otro lado, un represor en el cromosoma que inhibe la expresión del gen. Esto quiere decir que cuando visualicemos las células por citometría de flujo, no detectaremos fluorescencia en las células donadoras, debido a la acción del represor; sin embargo, sí que serán fluorescentes aquellas células a las que se haya podido transferir el plásmido por conjugación.

Inicialmente se realizó una construcción que se integró en el plásmido conjugativo R388. Dicha construcción contenía el gen *ytvA*, que codifica para la proteína fluorescente FbFP, bajo la acción del promotor sintético PA1/04/03 modificado para poder aumentar la expresión del gen y un gen de resistencia a un antibiótico como marcador de selección. El plásmido R388 es un plásmido conjugativo natural de la familia IncW, de amplio espectro de diseminación y que confiere

resistencia a trimetoprim y sulfonamidas. Sin embargo, al testar la fluorescencia de la construcción en condiciones anaeróbicas, la señal fluorescente emitida por la proteína no era lo suficientemente elevada como para ser diferenciada de la autofluorescencia emitida por la microbiota intestinal murina que se pretendía usar posteriormente como población aceptora en los experimentos. Tras testar diferentes promotores sin conseguir aumentar significativamente la fluorescencia en condiciones anaeróbicas y tras la reciente publicación de una variante de la proteína GFP denominada superfolderGFP (sfGFP), modificada para requerir únicamente una breve exposición a oxígeno para plegarse de manera correcta y poder emitir fluorescencia (12), decidimos cambiar el gen reportero de nuestra construcción. Dicho cambio fue motivado por el hecho de que la fluorescencia de GFP es considerablemente mayor que la de la proteína FbFP.

La nueva construcción diseñada constaba del gen *sfgfp* regulado por dos promotores diferentes: Ptet o Plac, promotores del gen que confiere resistencia a tetraciclina y del operón lactosa, respectivamente. Además, dicha construcción codificaba un gen que confiere resistencia a cloranfenicol. Esta construcción fue introducida por un proceso de recombinación homóloga en los plásmidos conjugativos R388 y RP4. Ambos plásmidos son naturales, de amplio espectro de diseminación y codifican varios genes de resistencia a antibióticos. Al utilizar dos plásmidos distintos y expresar la fluorescencia bajo dos promotores distintos pretendíamos aumentar nuestra capacidad de detectar distintas bacteriasceptoras, capaces de adquirir los plásmidos conjugativos.

Una vez comprobada que la señal fluorescente de esta proteína sí que era suficiente para poder diferenciarla de la señal basal de fluorescencia que presentaban algunas bacterias de la microbiota intestinal, transferimos los plásmidos conjugativos a una cepa de *Escherichia coli* que contiene en su genoma el represor tanto para el promotor Ptet como para el promotor Plac, de forma que las bacterias donadoras no expresan el gen que confiere fluorescencia y tan solo se detectaran como fluorescentes las células de la microbiota que hayan adquirido el plásmido conjugativo.

Posteriormente se realizaron experimentos *ex vivo* con microbiota cecal murina como población aceptora de los plásmidos conjugativos. Se realizaron dos tipos de experimentos, con la microbiota cecal recién obtenida del ratón o con la microbiota cecal que previamente había sido cultivada durante 6 días. Sorprendentemente, únicamente pudimos detectar bacterias transconjugantes (TC), que habían adquirido el plásmido conjugativo, cuando se utilizó la microbiota cultivada como bacteriasceptoras. Una posible explicación a los resultados obtenidos sería que las bacterias con una mayor eficiencia en la adquisición de los plásmidos conjugativos se encuentran en muy baja abundancia en la microbiota cecal y necesitan expandir para poder adquirir los plásmidos conjugativos y ser detectadas por citometría.

Las bacterias detectadas como TC fueron separadas mediante citometría de flujo en colaboración con el grupo del Dr. Sorensen en la Universidad de Copenhague, y el gen 16S rRNA fue secuenciado en la plataforma MiSeq (Illumina) con el fin de identificar la taxonomía de las bacterias que habían adquirido el plásmido conjugativo. Las secuencias obtenidas fueron posteriormente procesadas mediante el paquete bioinformático DADA2, el cual presenta un algoritmo que permite corregir posibles errores en las secuencias que se hayan podido generar durante el proceso de secuenciación. Finalmente, DADA2 identifica todas aquellas variantes únicas de secuencia (ASVs) del gen 16S rRNA y nos indica el número de veces que dichas ASVs fueron detectadas en cada muestra. Además, asigna taxonomía hasta nivel de género a cada una de las ASVs detectadas.

Los análisis posteriores de las secuencias mostraron que los plásmidos conjugativos fueron capaces de transferirse a bacterias de los filos más abundantes de la microbiota (Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria) además de a otros menos abundantes (Fusobacteria). Además, encontramos TC en todas las clases más abundantes dentro de los filos ya descritos (Clostridia, Bacilli, Bacteroidia, Actinobacteria, Alpha, Beta y Gammaproteobacteria). Sin embargo, cabe destacar que, dentro de las distintas clases bacterianas, no todos los géneros bacterianos eran igual de eficientes al adquirir el plásmido. Además, detectamos gran variabilidad entre las distintas muestras secuenciadas de distintos experimentos en los que se utilizaron

distintos plásmidos o incluso en experimentos distintos utilizando el mismo tipo de plásmido.

Centrándonos en el nivel de género, la secuenciación del gen 16S rRNA bacteriano fue capaz de detectar 56 géneros bacterianos en los que el evento de conjugación ocurre en más de una ocasión (detectado en al menos dos experimentos de conjugación). Entre los géneros bacterianos considerados como los mejores aceptores de los plásmidos conjugativos estudiados, es decir, aquellos en los que observamos TC en más del 33% de los casos testados, encontramos 22 géneros diferentes de la microbiota cecal murina. Varios de estos géneros incluyen bacterias que suelen causar infecciones oportunistas en humanos (i.e. *Pseudomonas*, *Escherichia/Shigella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*), lo que implica que estas bacterias tienen facilidad para adquirir por conjugación genes de resistencia a antibióticos que pueden dificultar su tratamiento. Por otro lado, también detectamos transferencia a bacterias comensales que se encuentran frecuentemente en ratones (i.e. *Veillonella*, *Bacteroides*) y que, por tanto, podrían actuar como reservorio de estas multirresistencias y transferirlas posteriormente a otros patógenos que colonizasen el intestino. Al realizar un análisis global de los resultados, encontramos dos géneros bacterianos capaces de adquirir los plásmidos conjugativos de forma muy eficiente, pues son detectados en más del 80% del total de muestras analizadas: *Pseudomonas*, y *Bacteroides*. Será necesario realizar estudios adicionales para estudiar si estas bacterias, además de adquirir el plásmido conjugativo, son capaces de mantenerlo y transferirlo a otras bacterias.

También se realizaron experimentos *ex vivo* utilizando microbiota fecal humana como población aceptora de los plásmidos. En este caso fuimos capaces de detectar TC a distintos taxones de la microbiota, tanto al utilizar la microbiota humana cultivada como sin cultivar. Al igual que ocurría con la microbiota de ratón, se detectó que la diseminación no ocurría por igual en todas las bacterias de la microbiota, pero fuimos capaces de detectar TC en los filos más abundantes de la microbiota, y en todas sus clases, además de en otros filos menos abundantes.

En este caso se detectaron 26 géneros diferentes en los cuales se pudo confirmar el evento de adquisición del plásmido conjugativo en al menos dos ocasiones. Entre los géneros clasificados como más relevantes en la adquisición de los plásmidos conjugativos (aquellos donde se detectaron TC en >33% de las muestras analizadas) se detectaron 10 géneros diferentes, muchos de los cuales son capaces de producir infecciones graves en pacientes (i.e. *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Salmonella*) lo que revela una posible vía de generación de cepas multirresistentes. El género más representado en el caso de los experimentos con microbiota fecal humana fue *Escherichia/Shigella* lo que no es de extrañar teniendo en cuenta que la bacteria donadora es *E.coli* y aunque se trate de plásmidos de amplio espectro es posible que se transfieran con mayor facilidad entre especies filogenéticamente relacionadas.

En esta misma línea encontraríamos el resto de enterobacterias donde detectamos transferencia del plásmido de manera frecuente. Además, cabe destacar que la transferencia detectada a este tipo de bacterias fue más frecuente cuando se utilizó como población aceptora la microbiota intestinal cultivada. Probablemente esto se deba a que, durante el cultivo, estos géneros bacterianos son capaces de expandir y se encuentran más representados en el momento de la conjugación. No obstante, la metodología desarrollada nos permitió detectar transferencia de los plásmidos conjugativos no solamente entre enterobacterias, como cabría esperar por la proximidad filogenética con la bacteria donadora, sino también a otro tipo de bacterias pertenecientes a filos filogenéticamente muy distantes como es el caso de Firmicutes y Bacteroidetes. De hecho, entre los géneros bacterianos que más frecuentemente adquirieron los plásmidos conjugativos en la microbiota humana encontramos los géneros *Bacteroides* (filo Bacteroidetes), *Dorea*, y *Clostridium XIVa* (filo Firmicutes), géneros muy prevalentes en la microbiota intestinal humana (13,14).

De entre los géneros bacterianos en los que observamos una mayor frecuencia de adquisición de los plásmidos conjugativos, únicamente 3 (*Bacteroides*, *Pelomonas* y *Escherichia/Shigella*) aparecieron tanto en los experimentos realizados con microbiota humana como en los realizados con microbiota de ratón, reafirmando su posible

importancia en la diseminación de resistencias a antibióticos mediante plásmidos conjugativos.

Por otro lado, también se utilizaron las construcciones diseñadas para estudiar la TGH de los plásmidos *in vivo* utilizando un modelo de ratón. Nuestros resultados sugieren que la colonización intestinal es importante a la hora de que el plásmido pueda diseminarse por lo que necesitamos recurrir a un tratamiento con 5 g/l de estreptomicina para que la cepa donadora (*E. coli* stp^R/ RP4::Ptet::sfGFP) colonice el intestino de ratón. Como nuestro objetivo es poder estudiar la transmisión de plásmidos a una microbiota lo más diversa posible, una vez la bacteria donadora ha colonizado el intestino se realizó un trasplante fecal (TF) con heces frescas humanas y, al día siguiente se realizó un tratamiento antibiótico con kanamicina y ampicilina, antibióticos para los cuales confiere resistencia el plásmido, con el fin de permitir la expansión y detección por citometría de aquellas bacterias que hubiesen adquirido el plásmido conjugativo. Los resultados sugieren que el modelo diseñado es capaz de detectar transferencia del EGM *in vivo*; sin embargo, todavía no disponemos de los resultados de secuenciación que nos informarán qué bacterias concretas de la microbiota han adquirido el plásmido conjugativo.

2. Estudio de la evolución *in vivo* a corto plazo de aislados clínicos multirresistentes.

La capacidad de adaptación y evolución continua de las enterobacterias queda patente al observar la velocidad con la que adquieren genes de resistencia a antibióticos que obligan a utilizar fármacos alternativos en los pacientes infectados. Dichos fármacos alternativos suelen tener una menor efectividad además de presentar mayores costes y toxicidad. En este trabajo se pretende estudiar *in vivo* fenómenos de TGH que puedan contribuir a la evolución a corto plazo de enterobacterias multirresistentes (EMR), centrándonos especialmente en la adquisición de nuevas resistencias a antibióticos a través de la captación de EGM, aplicando la tecnología de secuenciación de genomas completos.

El modelo con el que trabajamos lo constituyen muestras fecales de pacientes con leucemia aguda ingresados en el Hospital La Fe de Valencia que reciben ciprofloxacina como tratamiento profiláctico acompañado en ocasiones de otros antibióticos en función de la necesidad de cada paciente. Las características de inmunosupresión y tratamiento con antibiótico convierten a estos pacientes en especialmente susceptibles a la colonización intestinal por patógenos resistentes a antibióticos, incluyendo las enterobacterias multirresistentes (9).

Se recogieron semanalmente muestras perianales de los pacientes hospitalizados que eran sembradas para aislar las enterobacterias multirresistentes (EMR) de su microbiota. La identificación de las colonias detectadas fue comprobada mediante espectrometría de masas MALDITOF y su patrón de resistencias a antibióticos se detectó mediante Vitek y disco-difusión. Los aislados fueron considerados multirresistentes de acuerdo con la definición establecida por Magiorakos y colaboradores (15), es decir, la cepa aislada no es susceptible a al menos un agente en 3 o más categorías antimicrobianas, sin tener en cuenta aquellos para los que la bacteria es intrínsecamente resistente.

De las muestras recogidas se seleccionaron aquellas cepas de EMR que hubiesen sido identificadas en varias muestras consecutivas del mismo paciente y que hubiesen adquirido nuevas resistencias (cambio en el antibiograma de sensible a resistente) en alguno de los antibióticos testados en un plazo máximo de dos semanas entre el primer y segundo aislado. De esta forma se seleccionaron un total de 52 muestras provenientes de 26 pacientes de forma emparejada, previa y posterior al cambio en el perfil de sensibilidad. Para cada pareja tendremos un aislado multirresistente inicial y un segundo aislado posterior en el tiempo con una resistencia a antibiótico extra además de las que contaba el aislado inicial. A partir de este momento nombraremos como "A" al primer aislado y "B" al segundo aislado de cada pareja. Entre las bacterias seleccionadas encontramos: 4 parejas pertenecientes al complejo *Enterobacter hormaechei*, 5 parejas de *Klebsiella oxytoca*, 7 *Klebsiella pneumoniae* y 10 parejas de *E. coli*.

Para las bacterias seleccionadas se extrajo su ADN mediante el sistema NucliSENS easyMAG y se secuenció su genoma completo con la plataforma Illumina NextSeq 500, usando el kit de preparación de librerías Nextera XT, obteniendo como resultado lecturas emparejadas de secuencias de DNA de 150 nt. En nuestro caso, por algún motivo que desconocemos, el número de secuencias iniciales obtenidas fue muy bajo de forma que no se podrían realizar análisis posteriores de buena calidad, por lo que fue necesario repetir la secuenciación reutilizando las librerías generadas.

Las lecturas sin procesar se limpiaron utilizando el programa PRINSEQ para eliminar los adaptadores y secuencias de baja calidad y se utilizó Kmer ID para verificar la identidad de las cepas. Después, mediante ARIBA, se tiparon los aislados utilizando la técnica MLST, por sus siglas en inglés "Multi Locus Sequence Typing", que permite una caracterización taxonómica de las bacterias atendiendo a la secuencia de fragmentos internos de unos 450-500 pb pertenecientes generalmente a 7 genes de mantenimiento. Las diferentes combinaciones de alelos definen el perfil alélico o secuenciotipo (ST) de cada aislado. Los genes de mantenimiento están evolutivamente muy conservados, por lo que no se espera que haya diferencias en el ST de dos miembros de la pareja si se trata realmente de una misma cepa aislada con 15 días de diferencia en las heces de un mismo paciente. Por eso, todas aquellas parejas cuyos miembros A y B no compartían el mismo ST fueron descartadas del estudio considerando que nos encontrábamos ante fenómenos de co-colonización de los pacientes con enterobacterias de la misma especie.

En segundo lugar, para descartar fenómenos de co-colonización que puedan quedar enmascarados mediante el tipado molecular de solo 7 genes, se calculó el número de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) entre los genomas completos de las parejas. Para ello, se mapearon las lecturas filtradas contra una referencia de la especie correspondiente con el programa Snippy y se obtuvieron las posiciones variantes. A continuación se alinearon todas las secuencias mapeadas para obtener una matriz de distancias con la ayuda del programa snp-dists, el cual nos indica el número de SNPs existentes entre cada aislado de la misma especie bacteriana. Los resultados mostraron que, excepto en un caso que fue descartado del estudio, los aislados de una misma pareja acumulan menos SNPs diferentes que cualquiera de ellos

con aislados de otras parejas, por lo que asumimos que nos encontramos ante fenómenos de evolución bacteriana intra-paciente en lugar de estar observando fenómenos de co-colonización.

Finalmente, se estudió en profundidad cada una de las parejas con el objetivo de buscar genes de resistencia y plásmidos que pudiesen haber sido adquiridos en el aislado B de la pareja con el programa ARIBA, utilizando las bases de datos MEGARes y PlasmidFinder respectivamente. Además, se compararon las secuencias ensambladas de los aislados A y B de cada pareja a través de BANDAGE. En caso de encontrar información genética adquirida por el aislado B, se buscó la anotación asignada mediante Prokka, lo que nos permite conocer la función de estos genes. Además, se intentó averiguar su localización (plasmídica o cromosómica) observando el resto de genes que le acompañan en ese mismo fragmento ensamblado o contig. Por último, para cada pareja se localizó la posición de sus SNPs pudiendo detectar de este modo posibles mutaciones en genes importantes para la resistencia a antibióticos o incluso en los promotores de dichos genes que puedan modificar la expresión de las proteínas para las que codifican. Con toda esta información, se intentó explicar la adquisición de resistencias a antibióticos reportada en los laboratorios clínicos y tratar de identificar EGM que hubiesen sido adquiridos por la bacteria B.

En primer lugar, debemos destacar la detección de adquisición de algún tipo de EGM (transposón o plásmido) en 7 de las parejas estudiadas. Es verdad que la selección de las muestras propicia la detección de este tipo de material genético, pues sabemos que los genes de resistencia a antibióticos se localizan frecuentemente en EGM; sin embargo, únicamente en 3 de los casos esta adquisición estuvo relacionada con las nuevas resistencias observadas fenotípicamente lo que sugiere que la transferencia de EGM *in vivo* en los pacientes con leucemia aguda hospitalizados ocurre con elevada frecuencia. Diversos estudios publicados relacionan la activación de la respuesta SOS celular ante situación de estrés (i.e. tratamiento con ciprofloxacina u otros antibióticos) con un aumento de la frecuencia de TGH (16). Teniendo en cuenta la administración profiláctica de ciprofloxacina a los pacientes con leucemia que ingresan en el hospital, acompañada en múltiples ocasiones de otros fármacos para

combatir las infecciones, no es de extrañar la elevada frecuencia de adquisición de EGM que se detecta en las EMR aisladas en las muestras fecales de estos pacientes.

En segundo lugar, cabe destacar la detección de mutaciones en genes relacionados con la resistencia a antibióticos en 6 de las parejas estudiadas. Para 5 de estas parejas, las mutaciones se localizaban en genes relacionados con sistemas de transporte o porinas. Además, en 3 ocasiones, correspondientes con 3 especies bacterianas diferentes y siempre con una resistencia adquirida a un antibiótico betalactámico, la proteína afectada era BamA. Esta proteína de membrana externa forma parte del complejo BAM y posee una doble función, por un lado facilita el plegamiento de las proteínas en forma de barriles β para su inserción en la membrana externa y por otro regula la entrada de ciertos compuestos, como los antibióticos, al interior celular (17). Se trata de una de las principales dianas en estudio para el diseño de nuevos fármacos antimicrobianos e incluso posibles epítomos para vacunas. Por tanto, creemos conveniente que en un futuro se amplíe la investigación realizada en esta tesis con estudios adicionales detallados de las mutaciones detectadas en nuestro trabajo en los genes que codifican para la proteína BamA y para el resto de las proteínas de transporte con el fin de ampliar nuestros conocimientos sobre la relación entre las porinas y la susceptibilidad a los antibióticos.

En tercer lugar, quedan 5 de las parejas para las que, con los datos de los que disponemos, no se ha podido sugerir ningún posible mecanismo que explique la adquisición de resistencia. Podrían existir otros mecanismos implicados que se escapan de los sistemas tradicionales de detección de resistencias a antibióticos, por ejemplo, los genes implicados en el metabolismo bacteriano (18) u otros mecanismos que no hayan sido todavía descritos y que podrían jugar un papel fundamental.

3. Estudio de la interacción dieta-microbiota en las infecciones producidas por patógenos multirresistentes.

Como ya hemos indicado en el objetivo 1, los patógenos oportunistas pueden actuar a modo de reservorios de GRAs favoreciendo la diseminación de estos en los

momentos de disbiosis en los que tienen oportunidad de expandir en el intestino. Uno de los principales factores causantes de disbiosis intestinal es el tratamiento con antibióticos. Otro de los factores que ejerce un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis intestinal es la dieta (19). De hecho, las dietas ricas en grasas y/o azúcares simples que recientemente se están implantando en nuestras sociedades occidentales (dieta occidental, DO) pueden eliminar bacterias comensales concretas, lo que provoca una disminución significativa de la diversidad microbiana (11). Por tanto, nos planteamos si una dieta occidental (DO) podría favorecer la diseminación de plásmidos conjugativos que contienen GRAs mediante la facilitación de la colonización y expansión intestinal de patógenos oportunistas como *E. coli*. Sin embargo, la microbiota intestinal de ratones alimentados durante 8 semanas con DO mantiene su resistencia a la colonización por *E. coli*. Por ello decidimos testar el efecto sobre el enterococo vancomicina resistente (VRE), otro patógeno oportunista multirresistente muy importante en las infecciones hospitalarias y con el cual nuestro grupo ha estado trabajando intensamente durante la última década. En este caso, sí que observamos que la DO permitía la colonización de VRE en el intestino de los ratones en niveles similares a los que se obtienen tras un tratamiento con estreptomicina, a diferencia de lo que ocurre en ratones alimentados con una dieta convencional (DC), los cuales son completamente resistentes a la colonización por VRE. Desafortunadamente, las cepas y condiciones de las que disponemos actualmente no nos posibilitaron el estudio de diseminación de EGM entre cepas de VRE durante la DO en ratones. Actualmente estamos trabajando en la selección de cepas de VRE que puedan co-colonizar el intestino durante la DO, que presenten plásmidos conjugativos y que presenten distinta resistencia a antibióticos con el fin de poder trazar la diseminación del plásmido de la cepa aceptora a la donadora. Sin embargo, la relevancia del resultado obtenido nos animó a estudiar en mayor profundidad el efecto de la dieta en la colonización por este patógeno oportunista.

El primer paso en nuestro estudio consistió en evaluar la disrupción de la microbiota intestinal causada por la DO. El análisis de las heces procedentes de ratones alimentados con DC y DO mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA nos permitió confirmar que la DO induce cambios en la estructura global de la

microbiota y una disminución significativa de la diversidad bacteriana. Esta disrupción de la microbiota por la DO es similar a la que ocurre tras un tratamiento con estreptomicina. Además, los niveles de colonización de VRE en los ratones alimentados con la DO correlacionan positivamente con el grado de disrupción de la microbiota intestinal de modo que, a mayores cambios encontrados en la composición de la microbiota en comparación a un ratón alimentado con DC, mayores son los niveles de patógeno detectados en las heces. Por otro lado, el retorno de los ratones a una DC durante dos semanas hace que se restaure la resistencia a la colonización por VRE y se recupere parcialmente la composición de la microbiota.

Al realizar un análisis más detallado sobre aquellos taxones concretos que se modifican durante los cambios de dieta, pudimos apreciar que la administración de la DO tiene un efecto diferente según los géneros analizados. Ciertos géneros bacterianos aumentan o disminuyen su abundancia con la DO, pero sus niveles se recuperan tras las dos semanas de alimentación con DC (i.e. *Akkermansia*, *Prevotella*, *Barnesiella*, *Clostridium*, etc.). Sin embargo, la abundancia de otras bacterias, cuya abundancia relativa disminuye durante la DO, no se recupera tras dos semanas de alimentación con DC (i.e. *Anaeroplasma*, *Alloprevotella*, *Vampirovibrio* y *Turicibacter*). Esto se deba probablemente a que dichas bacterias fueron totalmente eliminadas del intestino durante la administración de la DO, lo que nos muestra que ciertos cambios en la microbiota producidos por la DO pueden ser irreversibles.

La correlación realizada entre la abundancia relativa de aquellas bacterias que sufren modificaciones durante la DO y los niveles fecales de VRE detectados en los ratones alimentados con DO nos permitió identificar un par de géneros con correlación significativa: *Barnesiella* y *Clostridium*. Los ratones con una mayor abundancia de *Barnesiella* parecen ser más resistente a VRE durante la DO y lo contrario sucede con *Clostridium*. Estos resultados sugerían que *Clostridium* pudiera tener un papel promotor de la colonización intestinal de VRE y que *Barnesiella* pudiera tener un papel protector frente a VRE. De hecho, estudios previos de nuestro grupo habían identificado una asociación entre la presencia de *Barnesiella* y la resistencia a la colonización por VRE tanto en ratones tratados con antibióticos como en pacientes hospitalizados (20).

En un estudio publicado recientemente se había detectado que algunos de los cambios producidos por la DO en la microbiota intestinal de ratones podían ser transmitidos a la descendencia y se mantenían incluso tras administrar de nuevo una dieta control (11). Sin embargo, en dicho estudio no se evaluó la relevancia de estos cambios en el proceso de colonización intestinal por patógenos multirresistentes. Con el objetivo de clarificar la persistencia de los cambios detectados en la microbiota tras el consumo de la DO, crías de ratonas alimentadas con DO fueron mantenidas en este tipo de dieta o alimentadas durante 8 semanas tras el destete con DC. Los resultados obtenidos mostraron que las crías alimentadas con DC, provenientes de madres alimentadas con DO, mantuvieron algunos de los cambios en su microbiota producidos por la DO, lo que concuerda con el estudio publicado (11). Sin embargo, en nuestro estudio detectamos que la recuperación parcial de la microbiota en dichos ratones, tras administrar la DC, fue suficiente como para conferir de nuevo resistencia a la colonización. Concretamente detectamos que *Barnesiella* y *Clostridium* recuperan niveles similares a los encontrados en los ratones alimentados con DC sugiriendo que los cambios en estas bacterias concretas son reversibles y quizá relevantes para conferir de nuevo protección frente a VRE.

En los resultados obtenidos habíamos demostrado que durante la administración de la DO se produce una disbiosis y se promueve la colonización por patógenos multirresistentes (VRE), lo que sugería que los cambios en la microbiota podrían ser relevantes para la colonización intestinal por VRE. Para corroborar esta hipótesis, se utilizó un modelo de ratón en el que se administró una antibioterapia extensa con alternancia de antibióticos de elevada y baja absorción sistémica con el fin de eliminar casi en su totalidad la microbiota intestinal de los ratones (21). Tras finalizar el tratamiento, se restauró su microbiota con la microbiota intestinal procedentes de ratones alimentados con DC o DO durante 8 semanas y se estudiaron los niveles de colonización por VRE.

Los resultados muestran que los ratones trasplantados con una microbiota procedente de ratones alimentados con DO son más susceptibles a la colonización por VRE, aunque se alimenten con DC, que aquellos trasplantados con una microbiota procedente de ratones alimentados con DC. Además, los ratones trasplantados con la

microbiota de ratones alimentados con DO presentaban una microbiota similar a la de estos ratones: menor diversidad microbiana, menores niveles de *Barnesiella* y mayores niveles de *Clostridium*. Estos resultados sugieren que los cambios en la microbiota inducidos por la DO tienen un efecto en la colonización por VRE independiente de la dieta administrada al ratón.

Respecto a la relevancia de cambios específicos en la microbiota producidos por la DO en el proceso de colonización de VRE, cabe destacar que estudios en paralelo realizados por otros miembros de nuestro grupo de investigación han demostrado que la inoculación de *Barnesiella* disminuye los niveles de colonización por VRE en ratones tratados con vancomicina. Este resultado sugiere que *Barnesiella* es una bacteria que confiere protección frente a VRE y que la disminución de *Barnesiella* por la DO podría ser clave en el proceso de colonización de VRE.

Respecto al posible mecanismo de cómo la DO podría promover la colonización intestinal por VRE, de manera paralela a esta tesis, nuestro grupo detectó una reducción de la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), derivados del metabolismo de azúcares complejos, en ratones alimentados con DO, similar a lo ya descrito por otros grupos de investigación (22). Cabe destacar que los AGCC son metabolitos producidos por la microbiota intestinal que tienen efecto inhibitorio sobre algunos patógenos. Consecuentemente, se testó y demostró que los AGCC inhiben el crecimiento de VRE *in vitro* y que la administración de AGCC en el agua de bebida de los ratones alimentados con DO disminuye los niveles de colonización de VRE. Estudios adicionales serán necesarios para demostrar si existe una relación entre *Barnesiella* y la producción de AGCC de forma que el descenso en los niveles de esta bacteria disminuiría la producción de AGCC permitiendo la colonización por VRE, o si por el contrario, existen una combinación de mecanismos distintos que explicarían el efecto global de la DO en la colonización intestinal del patógeno.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Importancia de la resistencia a antibióticos	3
1.2. Infecciones por cepas multirresistentes	6
1.3. Tipos de Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	7
1.4. Adquisición de resistencias	9
1.4.1. Transferencia genética horizontal.....	10
1.4.1.1. Transformación	11
1.4.1.2. Transducción	12
1.4.1.3. Vesículas de fusión.....	13
1.4.1.4. Conjugación.....	14
1.4.1.4.1. Plásmidos conjugativos.....	15
1.5. El tracto intestinal como punto de TGH.....	17
1.5.1. Microbiota intestinal.....	19
1.5.2. Funciones de la microbiota intestinal	20
1.5.2.1. Resistencia indirecta a la colonización.....	21
1.5.2.2. Resistencia directa a la colonización.....	23
1.6. Disbiosis.....	25
1.6.1. Disbiosis causada por antibióticos	25
1.6.2. Disbiosis producida por la dieta	27
1.6.3. Disbiosis producida por inflamación	29
1.7. Restauración de la microbiota (Trasplante fecal)	30
1.8. Estudios de TGH	31
1.9. Genes de Fluorescencia	33
1.9.1. Proteína verde fluorescente (GFP).....	33
1.9.2. Proteínas fluorescentes basadas en el mononucleótido de flavina (FbFP)	34
2. Objetivos	37
3. Material y Métodos.....	41
3.1. Cepas y Medios de cultivo utilizados durante el estudio.....	43
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	43
3.1.2. <i>Enterococcus faecium</i> (<i>E. faecium</i>)	43
3.1.3. Enterobacterias clínicas	44
3.2. Plásmidos conjugativos utilizados en el estudio	45
3.2.1. Plásmido R388.....	45

3.2.2.	Plásmido RP4	46
3.3.	Extracción de ADN	47
3.3.1.	Extracción de ADN plasmídico.....	47
3.3.2.	Extracción de ADN a partir de muestras fecales	48
3.3.3.	Extracción de ADN de las bacterias aisladas mediante la técnica de separación celular.....	48
3.3.4.	Extracción de ADN de los aislados clínicos multirresistentes	49
3.4.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	49
3.4.1.	PCR fusión.....	50
3.4.2.	PCR concatenada.....	51
3.5.	Visualización del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa	52
3.6.	Digestión y ligación.....	53
3.7.	Purificación del ADN mediante perlas magnéticas	54
3.8.	Protocolo de transformación de células <i>E. coli</i>	55
3.8.1.	Transformación de células mediante choque térmico.....	55
3.8.2.	Transformación de células mediante electroporación	56
3.9.	Metodología empleada en la elaboración de las construcciones necesarias para el estudio de diseminación de EGM en la microbiota intestinal	57
3.9.1.	Construcciones elaboradas utilizando como marcador fluorescente el gen <i>ytaA57</i>	
3.9.2.	Construcciones elaboradas utilizando como marcador fluorescente el gen <i>sfgfp68</i>	
3.10.	Experimentos de conjugación <i>in vitro</i>	71
3.11.	Experimentos de conjugación <i>ex vivo</i>	73
3.11.1.	Microbiota intestinal de ratón como población aceptora de los plásmidos conjugativos	73
3.11.2.	Microbiota intestinal humana como población aceptora de los plásmidos conjugativos	75
3.12.	Recuento celular mediante cámara Neubauer	76
3.13.	Experimentos con modelo de ratón	77
3.13.1.	Modelos de ratón utilizados para el estudio de la diseminación de EGM	78
3.13.2.	Modelos de ratón utilizados para el estudio de los efectos de la DO en colonización por patógenos multirresistentes.....	80
3.13.3.	Tratamiento con antibióticos	83
3.13.4.	Inoculación de la bacteria de interés	84
3.13.5.	Trasplante Fecal.....	85
3.14.	Citometría de flujo.....	86

3.15.	Separación celular (“sorting”).....	88
3.16.	Secuenciación masiva mediante la tecnología Illumina.....	90
3.16.1.	Secuenciación del gen 16S rRNA mediante la plataforma MiSeq de Illumina.....	90
3.16.2.	Secuenciación del genoma completo bacteriano mediante la plataforma NextSeq™ 500 de Illumina	91
3.17.	Análisis de la secuenciación del gen 16S rRNA	92
3.17.1.	Filtrado de las secuencias.....	92
3.17.2.	Análisis de Coordenadas Principales y Agrupación jerárquica.....	93
3.17.3.	Análisis estadísticos.....	93
3.18.	Análisis de la secuenciación del genoma completo bacteriano.....	94
3.18.1.	Análisis de calidad y filtrado de las secuencias.....	94
3.18.2.	Reconstrucción del genoma de las enterobacterias	95
3.18.2.1.	Ensamblado del genoma.....	95
3.18.3.	Mapeo de las lecturas frente a un genoma de referencia.....	96
3.18.4.	Análisis filogenético	97
3.18.5.	Tipado molecular.....	97
3.18.6.	Análisis de genes de resistencia a antibióticos	98
3.18.7.	Comparación de los aislados.....	100
4.	Resultados	113
4.1.	Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal.....	115
4.1.1.	Elaboración de las construcciones necesarias para el estudio de diseminación de EGM en la microbiota intestinal.....	115
4.1.1.1.	Utilización de la proteína fluorescente FbFP con el fin de detectar diseminación de EGM en el ambiente anaeróbico intestinal.	115
4.1.1.2.	Utilización de la proteína fluorescente sfGFP con el fin de detectar diseminación de EGM en el ambiente anaeróbico intestinal	123
4.1.2.	Diseminación de los plásmidos conjugativos en un modelo <i>in vitro</i>	126
4.1.3.	Diseminación de los plásmidos conjugativos en un modelo <i>ex vivo</i> con microbiota intestinal murina como población aceptora	128
4.1.4.	Diseminación de los plásmidos conjugativos en un modelo <i>ex vivo</i> con microbiota intestinal humana como población aceptora.....	145
4.1.5.	Diseminación de los plásmidos conjugativos en un modelo <i>in vivo</i>	159
4.2.	Estudio de la evolución <i>in vivo</i> a corto plazo aislados clínicos multirresistentes.	168
4.2.1.	Selección, recogida y caracterización de las enterobacterias multirresistentes.	168

4.2.2.	Utilización de la tecnología de secuenciación masiva para la obtención del genoma completo de los aislados clínicos.	171
4.2.3.	Análisis de las parejas de muestras para identificar evolución de las cepas frente a co-colonización del paciente.	173
4.2.3.1.	Tipado de los aislados mediante la técnica de MLST.	173
4.2.3.2.	Determinación de la distancia filogenética entre los aislados de cada pareja mediante el cálculo de SNPs y su reconstrucción evolutiva.	176
4.2.4.	Análisis de las secuencias de ADN de los aislados con el objetivo de detectar fenómenos de TGH que puedan explicar la evolución <i>in vivo</i> de las cepas clínicas.	180
4.3.	Estudio de la interacción dieta-microbiota en las infecciones producidas por patógenos multirresistentes.	194
4.3.1.	Dieta y colonización por patógenos multirresistentes.....	195
4.3.2.	Cambios en la microbiota intestinal debidos a la alimentación con dieta occidental	198
4.3.3.	Persistencia de los cambios inducidos por la DO en la microbiota	200
4.3.4.	Heredabilidad de los cambios inducidos por la DO en la microbiota	203
4.3.5.	Efecto de la restauración microbiana mediante trasplante fecal en la resistencia a la colonización por VRE	206
5.	Discusión	211
5.1.	Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal.....	213
5.1.1.	Proceso de diseño y construcción de una herramienta para estudiar diseminación de plásmidos a través de la detección de fluorescencia.....	213
5.1.2.	Resultados de la diseminación de EGM <i>ex vivo</i>	221
5.1.3.	Resultados de la diseminación de EGM <i>in vivo</i>	232
5.2.	Estudio de la evolución a corto plazo de enterobacterias multirresistentes.....	239
5.3.	Estudio de la interacción dieta-microbiota en las infecciones producidas por patógenos multirresistentes.	247
6.	Conclusiones.....	257
7.	Bibliografía	263
8.	Anexos.....	283

1. Introducción

1.1. Importancia de la resistencia a antibióticos

Uno de los logros sanitarios más relevantes del siglo XX, y que supuso un cambio total del paradigma terapéutico existente hasta el momento, fue el descubrimiento y la administración rutinaria de compuestos antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas (23). Sin embargo, en los últimos años se ha podido observar un incremento de las bacterias resistentes a estos antibióticos, lo que genera una seria amenaza para este logro hasta el punto de que la resistencia a antibióticos se ha convertido en uno de los mayores retos del sistema sanitario a nivel global.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a antibióticos es la habilidad de un microorganismo de resistir la acción de uno o más agentes antimicrobianos y está considerada como una de las tres amenazas más importantes de la salud pública del siglo XXI ya que cada vez existen menos antibióticos disponibles para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias resistentes lo que se convierte en un serio peligro para la vida del paciente (1).

Durante todo nuestro proyecto vamos a estudiar la diseminación de genes de resistencia a antibióticos desde diferentes aproximaciones por lo que es fundamental clarificar cuáles son los principales grupos de fármacos antimicrobianos existentes en clínica, su mecanismo de acción y espectro antibacteriano (Tabla I1).

Tabla 11. Principales grupos de fármacos antimicrobianos. Adaptado con permiso de la Guía-ABE (24)

Fármaco	Familias o principales representantes	Mecanismo de acción	Espectro antimicrobiano
Betalactámicos	Penicilinas (amoxicilina, ampicilina, piperacilina)	Inhiben la síntesis del peptidoglicano que forma la pared celular bacteriana	Efectivas frente a gram positivos. Las penicilinas de amplio espectro también frente a gram negativos.
	Cefalosporinas (ceftazidima, ceftriaxona)		La cuarta generación es la más activa frente a gram positivos y enterobacterias gram negativas.
	Monobactámicos (aztreonam)		Efectivo frente a bacterias gram positivas.
	Carbapenémicos (imipenem, meropenem, ertapenem).		Efectivo frente a gram positivos y negativos, poseen el mayor espectro de acción conocido.
	Inhibidores de las betalactamasas (ácido clavulánico, tazobactam)		Al usarse asociados a penicilinas de amplio espectro potencian su actividad al unirse de forma irreversible a las betalactamasas.
Aminoglucósidos	estreptomina, neomicina, kanamicina (amikacina, kanamicina, tobramicina), gentamicina, espectinomicina	Se unen a la subunidad ribosomal 30S bacteriana ocasionando la inhibición de la síntesis proteica o la producción de proteínas defectuosas.	Fundamentalmente Bacilos gram negativos aerobios.
Anfenicoles	Cloranfenicol	Inhiben la síntesis proteica.	Efectivo frente a gram positivos y negativos. Debido a su elevada toxicidad solo debe usarse cuando no haya una alternativa eficaz.
Glicopéptidos	Vancomicina	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	Muy activos frente a cocos gram positivos.

Lincosamidas	Clindamicina	Interfieren en la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S ribosomal de las bacterias	Se usan principalmente para infecciones graves por anaerobios.
Macrólidos	Eritromicina	Interfieren en la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S ribosomal de las bacterias.	Similar al de las penicilinas, pero también efectivo a frente a <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> y algunas rickettsias y clamidias.
Quinolonas	Ácido nalidíxico, ciprofloxacina	Inhiben la ADN-girasa bacteriana, enzima necesaria para el correcto plegamiento de la doble hélice del ADN.	El ácido nalidíxico es activo frente a gram negativos. Las fluoroquinolonas tienen un espectro antibacteriano más amplio y mejores condiciones farmacocinéticas para su uso en infecciones sistémicas.
Sulfamidas	Trimetoprim, cotrimoxazol	Inhiben la síntesis del ácido fólico.	La aparición de resistencias ha hecho que estén indicadas únicamente en el tratamiento de infecciones urinarias, algunas formas de gastroenteritis aguda y en alguna otra infección concreta.
Tetraciclinas	Tetraciclina, tigeciclina	Inhibición de la síntesis proteica.	Su amplio espectro inicial favoreció su uso frecuente y la aparición de resistencias, por lo que no suelen ser antibióticos de elección en infecciones por gram positivos y negativos hoy en día.

1.2. Infecciones por cepas multirresistentes

Las bacterias multirresistentes (MDR) se definen como aquellas que han adquirido resistencia como mínimo a un agente antimicrobiano en tres o más categorías antimicrobianas, sin tener en cuenta aquellos antibióticos para los que ya existía una resistencia intrínseca (15).

Las infecciones causadas por organismos MDR se asocian con un aumento de la mortalidad y la morbilidad en comparación a las causadas por bacterias susceptibles y conllevan una importante carga económica a nivel mundial. Estimaciones recientes basadas en los datos de 2018 de la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (EARS-Net) indican que en la Unión Europea cada año tienen lugar más de 670 000 infecciones debidas a bacterias resistentes a antibióticos y que, aproximadamente 33 000 personas mueren a consecuencia directa de este tipo de infecciones (25).

Las primeras bacterias resistentes aparecieron en los entornos hospitalarios; sin embargo, aunque los ambientes hospitalarios siguen siendo uno de los principales focos de infección hoy en día debido a la susceptibilidad de los pacientes ingresados, los reservorios de este tipo de bacterias están distribuidos también por entornos comunitarios no hospitalarios, como son el suelo, las aguas residuales y la microbiota intestinal de animales y humanos (23).

Tanto las bacterias gram positivas como las gram negativas se ven afectadas por la aparición y el aumento de la resistencia a los antibióticos, en nuestro estudio haremos principal hincapié en las enterobacterias multirresistentes (incluyendo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y los enterococos resistentes a vancomicina (VRE), patógenos oportunistas que se encuentran entre las bacterias que suponen un mayor riesgo a nivel global. Estos patógenos frecuentemente inician las infecciones mediante la colonización del tracto intestinal, desde donde pueden llegar a la sangre y diseminarse a otros órganos provocando infecciones graves que pueden incluso acabar con la vida del paciente, así como diseminación a otros pacientes a través de contaminación fecal en ambientes hospitalarios (2,3).

En 2018, más de la mitad de los aislados de *E. coli* notificados a la EARS-Net, y más de un tercio de los aislados de *K. pneumoniae*, eran resistentes a al menos un grupo de antibióticos y era frecuente la resistencia combinada a varios grupos antimicrobianos (Figura I1). La evolución de *Enterococcus faecium* vancomicina resistente (VRE) es igualmente alarmante con un incremento del porcentaje medio de aislados notificados en la Unión Europea del 10,5% en 2015 a 17,3% en 2018.

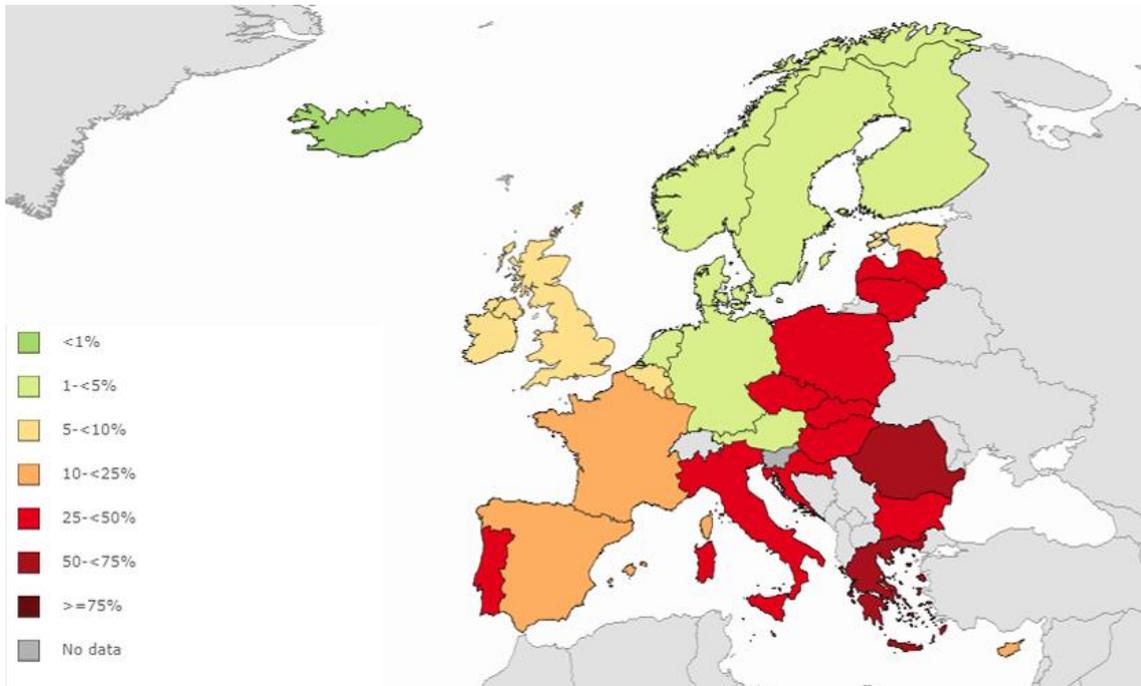


Figura I1. Porcentaje de aislados de *K. pneumoniae* con resistencia combinada a fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos, por países en 2019. Adaptado de ECDC, 2020.

1.3. Tipos de Mecanismos de resistencia a antibióticos

Las bacterias pueden defenderse de la actividad de los antibióticos a través de diversas estrategias: i) modificando el antibiótico, ii) evitando que el antibiótico alcance su diana, iii) modificando la diana, o iv) mediante procesos adaptativos globales.

El mecanismo más extendido es la modificación de la molécula de antibiótico mediante la síntesis bacteriana de un enzima capaz de alterar el fármaco de tal forma que pierde su efecto antes de alcanzar su diana. La inactivación del antibiótico puede

llevarse a cabo mediante enzimas intracelulares para aquellos antibióticos que tienen un blanco citoplasmático, como los aminoglucósidos y el cloranfenicol, o mediante enzimas como las betalactamasas que se excretan al medio externo o al espacio periplásmico donde degradan el enlace amida del anillo betalactámico haciendo que el antibiótico pierda su función (23).

Las bacterias pueden evitar que el antibiótico llegue a su diana cambiando la permeabilidad de su membrana a través de las porinas o mediante la aparición de bombas de flujo. Las porinas son unos canales que se sitúan en la membrana celular para permitir el intercambio de sustancias con el medio; los antibióticos hidrofílicos como los betalactámicos, tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas suelen utilizar esta vía de entrada por lo que son moléculas muy susceptibles a los cambios de permeabilidad de la célula (26). Normalmente los cambios de permeabilidad debidos a las porinas suelen asociarse con algún otro mecanismo de resistencia como el aumento de expresión de las bombas de flujo (23), que son capaces de expulsar el antibiótico hacia el exterior celular de forma que la concentración intracelular restante es insuficiente para ser tóxica.

Otra estrategia de resistencia es la protección, modificación o sustitución de la diana del antibiótico por parte de la célula para hacerse insensible a su acción. Un ejemplo de este mecanismo de camuflaje lo encontramos en las bacterias capaces de sintetizar una metilasa específica que modifica el ARN ribosomal de forma que los macrólidos pierden la afinidad por dicho ribosoma modificado (27).

Existe un último tipo de mecanismo de resistencia en el que la bacteria sufre un proceso de adaptación a nivel global para hacer frente al antibiótico. Es el caso de los aislados de *Staphylococcus aureus* con una sensibilidad intermedia a vancomicina. Aunque no se conoce con detalle la causa de la resistencia, se sabe que ésta no se debe a la adquisición de ADN exógeno sino que es el resultado de una serie de cambios genéticos secuenciales y ordenados que dan lugar a aislados con características fenotípicas diferentes a los aislados sensibles entre las que encontramos: incremento en el consumo de fructosa, incremento en el metabolismo de los ácidos grasos, alteración del metabolismo del acetato y ácido carboxílico, disminución de la

disponibilidad de glutamato y un incremento en la expresión de los genes de síntesis de la pared celular (28).

1.4. Adquisición de resistencias

La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede ser natural, o adquirida. Hablamos de resistencia natural cuando todas las cepas pertenecientes a la misma especie son resistentes a un antibiótico, como ocurre por ejemplo con la penicilina G para la cual todas las bacterias gram negativas son impermeables (29). Sin embargo, cuando la resistencia sólo aparece en algunas cepas de una especie bacteriana se habla de resistencia adquirida.

Un pequeño porcentaje de las resistencias adquiridas se debe a mutaciones puntuales que ocurren de forma espontánea en las células con una frecuencia de 10^{-6} a 10^{-9} , según el tipo de bacterias y las características ambientales (27). Mutaciones puntuales pueden por ejemplo conferir resistencia a estreptomicina (30); pese a su baja frecuencia, los clones mutantes pueden seleccionarse y establecerse rápidamente al tratar a la población general sensible con el antibiótico para el que se han hecho resistentes.

En algunos casos, mutaciones puntuales cromosómicas pueden conferir resistencia simultánea a varios antibióticos pertenecientes a familias diferentes i.e. betalactámicos, cloranfenicol, trimetoprim, tetraciclinas. La causa de esta multirresistencia que ocurre con particular frecuencia en algunas enterobacterias como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* (27) suele ser la mutación en los genes que codifican para las porinas.

Otra posibilidad existente, pero muy poco frecuente, es la aparición de un nuevo tipo de resistencia como consecuencia de mutaciones puntuales que modifican un gen de resistencia ya conocido, ampliando sus efectos. Es el caso de los genes que codifican algunas betalactamasas con acción restringida a las penicilinas y que, tras

una nueva mutación, el enzima posee actividad tanto frente a penicilinas como a cefalosporinas (27).

A pesar de la importancia de estos fenómenos citados es necesario señalar que la gran mayoría de los casos de resistencia bacteriana provienen de la adquisición de información genética exógena, un proceso que conocemos con el nombre de Transferencia Genética Horizontal (TGH).

1.4.1. Transferencia genética horizontal

La transferencia de genes entre bacterias permite una difusión rápida y extensa de la información genética tanto en bacterias gram positivas como gram negativas y se califica como “horizontal” puesto que ocurre de forma independiente a los procesos de reproducción. Los diferentes mecanismos que permiten esta transferencia horizontal son: la transducción, la transformación, la conjugación y las vesículas de fusión, los cuales podemos visualizar en la Figura I2 y vamos a desarrollar brevemente a continuación.

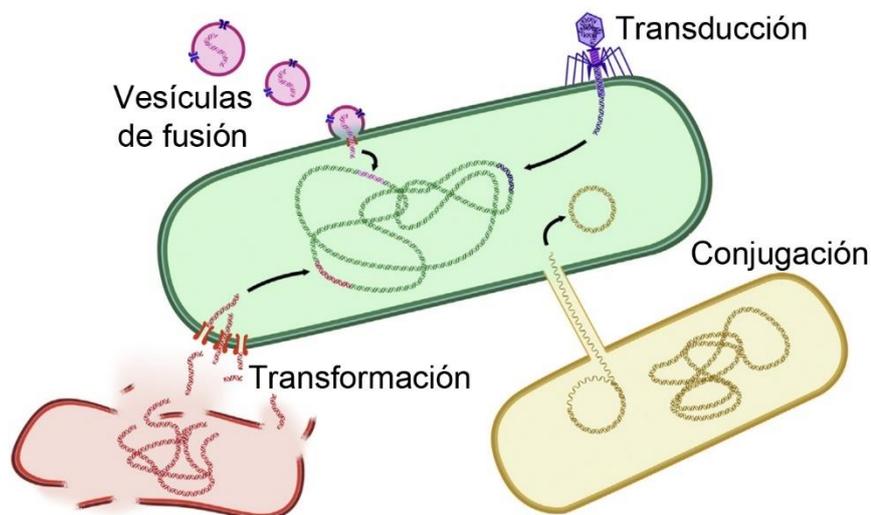


Figura I2. Mecanismos de TGH. En la transformación, ADN desnudo entra en el interior de una célula aceptora competente. En la transducción, el ADN viaja de una célula a otra a través de bacteriófagos. La conjugación implica intercambio de material entre dos células en contacto, mientras que las vesículas de fusión permiten el intercambio sin contacto celular. Imagen adaptada de McInnes et al.,2020 (31) con el permiso de ELSEVIER.

1.4.1.1. Transformación

La transformación natural fue descrita por primera vez en *Streptococcus pneumoniae* el año 1928 (32) y consiste en la adquisición, integración y expresión funcional de fragmentos desnudos de ADN extracelular que aparecen frecuentemente derivados de la muerte de otras bacterias.

Para que pueda tener lugar la transformación deben darse una serie de condiciones: debe de haber ADN en el medio extracelular, las bacterias receptoras deben estar en estado de competencia y el ADN adquirido debe ser estabilizado en el interior de la bacteria, bien mediante integración en el genoma, bien por recircularización (33). Algunas bacterias como *Neisseria* spp. son competentes de manera constitutiva, sin embargo, la mayoría desarrollan ese estado de competencia únicamente bajo ciertas condiciones ambientales, generalmente estresantes. Paradójicamente, ciertos estudios han demostrado que la exposición a antibióticos puede inducir competencia en bastantes especies bacterianas lo que significa que los tratamientos con antibiótico no solo seleccionarían las cepas resistentes, sino que además estimularían la transformación bacteriana pudiendo aparecer nuevas bacterias resistentes (34).

Cuando tiene lugar TGH por transformación, el resultado es un gen mosaico formado por secciones de ADN exógeno incorporado en el genoma de la célula receptora. El estudio del ADN exógeno puede darnos información sobre la bacteria de la que procede. Por ejemplo, en los estreptococos existe un mosaico de genes que codifican para las proteínas de unión a penicilina (PBP) y se piensa que aquellos que codifican para PBP con menor afinidad por los antibióticos betalactámicos han sido transferidos desde especies resistentes a la penicilina (35) y han diseminado la resistencia a varias especies de estreptococos. De igual modo, los estudios sobre fluoroquinolonas han demostrado que las variantes en mosaico de los genes *parC*, *parE*, y *gyrA* se transforman fácilmente entre diferentes especies de estreptococos (36).

Además, Domingues et al. (37) demostraron que elementos genéticos móviles (EGMs) tales como transposones, integrones y cassettes de genes pueden diseminarse

fácilmente por transformación independientemente de la relación filogenética entre las especies (37). Esto confiere al mecanismo de transformación la importante característica de ser capaz de diseminar genes de resistencia a antibióticos (GRAs) entre especies muy divergentes.

1.4.1.2. Transducción

Los bacteriófagos juegan un importante papel a la hora de la TGH. Cuando el virus entra en el interior de una bacteria, induce la fragmentación del cromosoma bacteriano a la vez que se forma el ADN vírico y las proteínas de la cápside. Estos fragmentos de ADN bacterianos tienen la posibilidad de quedar encapsulados junto con el ADN vírico introduciendo así algunos nuevos genes en la siguiente bacteria infectada por el virus. Para el virus, la transferencia de genes que confieren alguna ventaja a la bacteria huésped, como puedan ser los genes de resistencia a antibióticos, promueve paralelamente su supervivencia y diseminación (38).

Diferentes estudios han usado la técnica de qPCR para detectar GRAs en bacteriófagos procedentes de muestras fecales de animales y humanos, aguas residuales, aguas y lodos derivados de las plantas de tratamiento de aguas residuales y de hospitales, indicando que los bacteriófagos son un reservorio significativo de GRAs y poniendo de manifiesto que la diseminación de GRAs mediante bacteriófagos parece tener una mayor importancia de lo que se había considerado hasta el momento (39). Se han descrito casos de transferencia de GRAs por acción de bacteriófagos en diferentes especies como, por ejemplo, la transferencia de resistencia a tetraciclina y gentamicina entre enterococos (40); o los genes de betalactamasas en *E. coli* (41). Además, Modi y colaboradores demostraron que el tratamiento con antibióticos aumenta el número de GRAs en el genoma de los fagos intestinales de ratón y aumenta las interacciones entre fagos y especies bacterianas (38), lo cual es de especial relevancia teniendo en cuenta la creciente exposición ambiental a los antibióticos que experimentamos en la actualidad.

A pesar de que lo más habitual es que exista una estrecha especificidad entre virus y bacteria, limitando los intercambios a bacterias filogenéticamente cercanas, se han descrito bacteriófagos con un rango de hospedador más amplio que incluye bacterias de diferentes especies o incluso de diferentes clases taxonómicas (40), lo que abre una nueva perspectiva sobre el papel de la transducción en la diseminación de GRAs en ambientes microbianos.

1.4.1.3. Vesículas de fusión

Existen también unas partículas, descritas por primera vez en 1974 (42), estructuralmente parecidas a los bacteriófagos pero producidas por las mismas células bacterianas, que son capaces de transferir material genético entre las células y a las que llamaremos: vesículas de fusión.

Stanton sugirió en 2007 que estas vesículas presentan diversas ventajas en cuanto a transferencia genética horizontal en comparación con los distintos mecanismos estudiados hasta la fecha (43): por un lado, a diferencia de la transformación en la que el material genético se encuentra desnudo, estas partículas protegen el ADN de factores ambientales, además contienen exclusivamente fragmentos del genoma bacteriano en lugar de que la mayor parte de contenido genético sea vírico como ocurre con la transducción, y en comparación con la conjugación, la capacidad de transferencia de material genético no se restringe al contacto directo entre las células y no se pierde tras la muerte celular.

Al parecer, estas vesículas tendrían habilidad para intercambiar genes entre bacterias de diferentes filos (44), por lo que sería interesante estudiarlas más en profundidad para conocer su impacto en la transferencia de GRAs en los distintos ambientes.

1.4.1.4. Conjugación

Algunos investigadores consideran que el papel de la transformación y transducción en la TGH es meramente un efecto secundario derivado de otros procesos como la nutrición bacteriana, en el caso de la transformación, o la infección por bacteriófagos para la transducción. Sin embargo, la conjugación sería el único de estos mecanismos de TGH que ha evolucionado para transferir información genética entre bacterias (45). Este hecho, junto con la mayor protección del material genético a intercambiar hacen que el mecanismo de conjugación sea el que contribuye en mayor medida a la TGH y haya sido, por tanto, el más estudiado hasta la fecha.

La conjugación consiste en la transferencia de ADN de una bacteria donadora a una aceptora mediante un proceso de múltiples pasos que requiere el contacto célula a célula mediante pilis o adhesinas. La maquinaria necesaria para la conjugación está codificada en genes situados bien en plásmidos conjugativos que se replican de forma autónoma o mediante elementos conjugativos integrados en el cromosoma como integrones o transposones (46). Además, esta maquinaria puede permitir la movilización de otros plásmidos no conjugativos, como los IncQ (47).

Los GRAs están en muchas ocasiones asociados a dichos elementos conjugativos y su movilización ha sido observada en ambientes muy diversos: suelo, agua, bacterias de insectos, patógenos asociados con alimentos y salud (48). Aunque la frecuencia de conjugación es mayor entre bacterias filogenéticamente próximas, se ha descrito también transferencia de plásmidos y transposones, como los de la familia Tn916, entre bacterias filogenéticamente alejadas (49,50), lo que indica que la conjugación contribuye de forma significativa a la diseminación de GRAs entre distintos reservorios.

De entre los diferentes elementos conjugativos, los plásmidos son los más relevantes para la diseminación de GRAs pues son capaces de transportar más de un gen de resistencia debido a su mayor tamaño y a la presencia de módulos que aseguran el mantenimiento del plásmido en el interior de la célula hospedadora. Además, estos plásmidos contienen habitualmente otros genes que confieren ventaja selectiva a la bacteria como por ejemplo resistencia a metales pesados o genes que la

capacitan para usar nuevas rutas metabólicas, por lo que es posible que en estos elementos conjugativos aparezcan mecanismos de co-selección (51).

1.4.1.4.1. Plásmidos conjugativos

Los plásmidos son fragmentos circulares de ADN bicatenario de longitud variable que poseen la capacidad de replicarse en forma independiente del sistema de duplicación del material genético de la bacteria y que codifican genes no esenciales para el huésped.

Los plásmidos que codifican toda la maquinaria necesaria para su propia diseminación reciben el nombre de plásmidos conjugativos y suelen ser de mayor tamaño que los no conjugativos (52). La maquinaria y los elementos de secuencia necesarios para que un plásmido sea conjugativo incluyen un origen de transferencia (*oriT*), una relaxasa, una proteína acopladora (T4CP) y un sistema de secreción tipo IV (T4SS) (53). Algunos plásmidos no conjugativos poseen únicamente una parte de dicha maquinaria, su sistema T4SS está incompleto, por lo que para poder transferirse necesitan ser complementados por un elemento conjugativo que esté simultáneamente presente en la bacteria (54); son los llamados plásmidos movilizables.

Los plásmidos conjugativos están estructurados en módulos de genes que se agrupan según sus funciones (55). Los módulos típicos son: el módulo de replicación, que incluye el origen de replicación y genes que controlan el número de copias del plásmido; el de propagación, que contiene los genes necesario para la maquinaria de conjugación que hemos mencionado anteriormente; el de estabilidad, contiene genes que codifican para sistemas implicados en que el plásmido no se pierda; y el adaptativo, que contiene los genes que confieren una ventaja selectiva al huésped (Figura 13).

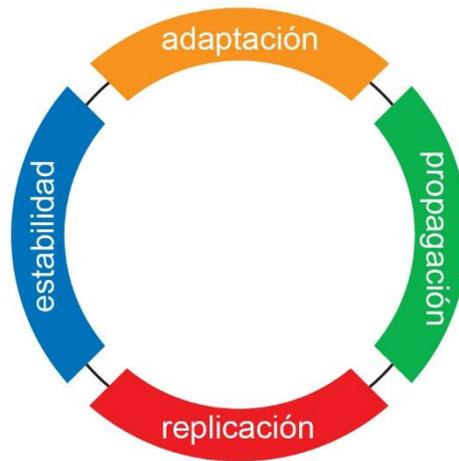


Figura I3. Representación esquemática de la organización genética en módulos típica de los plásmidos conjugativos. Los módulos de estabilidad, adaptación, propagación y replicación están representados en azul, naranja verde y rojo respectivamente. Figura adaptada de Norman et al., 2009 (45).

La diseminación de plásmidos que contienen resistencia a antibióticos entre patógenos humanos ha sido de especial interés de estudio y se sabe que una vez que los genes se han establecido con éxito en el interior de plásmidos, pueden diseminarse rápidamente entre distintas cepas, especies o incluso diferentes géneros bacterianos. Es el caso de los genes tipo *bla*_{CTX-M}, una betalactamasa de espectro extendido, que es codificada por varios plásmidos de enterobacterias y otros patógenos oportunistas, algunos de ellos de amplio espectro de diseminación y otros con un rango de hospedadores más estrecho (56). Hoy en día estos genes son ubicuos tanto en humanos, animales como en el medio ambiente (57,58).

Sin embargo, la diseminación de GRAs no está restringida a los antibióticos betalactámicos, sino que la transferencia de plásmidos ha dado lugar a una diseminación mundial de resistencias a antibióticos como las quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfonamidas, y otros (59). Es especialmente preocupante el aumento en la diseminación de plásmidos que contienen resistencia a carbapenémicos (60) y el reciente descubrimiento de plásmidos que codifican resistencia a colistina (61) que podrían hacer que las enterobacterias se conviertan en organismos resistentes a todos los antibióticos disponibles.

1.5. El tracto intestinal como punto de TGH

El uso indebido de antibióticos en la medicina, la agricultura y la acuicultura se ha relacionado tradicionalmente con la aparición de bacterias resistentes en estos entornos (62,63). De hecho, el aumento de la transmisión de GRAs de animales a humanos mediante *Salmonella* se viene notificando desde principios de los años setenta (64).

Al evaluar el intercambio genético de GRAs a través de TGH entre bacterias de diferentes ecosistemas, se ha observado que el agua y el suelo albergan algunas de las poblaciones microbianas más diversas y ampliamente distribuidas en las que se facilita el intercambio genético y la aparición de nuevos determinantes de resistencia (65). Por consiguiente, no es extraño que las aguas residuales de ambientes hospitalarios, contaminadas con antibióticos (66), puedan contribuir a la presión selectiva y al desarrollo de resistencias bacterianas que luego se propagan a las poblaciones bacterianas humanas por vectores como los roedores (67).

Del mismo modo, las plantas de tratamiento de aguas residuales que sirven a las instalaciones de producción de antibióticos exponen su entorno directo a niveles muy altos de antibióticos. En un estudio realizado por Larsson y colaboradores en 2007 (68) demostraron que en estos lugares se descargan alrededor de 45 Kg de ciprofloxacina por día contaminando la superficie, el suelo y el agua potable de las áreas colindantes. Como resultado, no solo se encontraron bacterias multirresistentes en el interior de la planta de tratamiento de aguas, sino que también se detectaron altos niveles de GRAs y EGM en sedimentos de ríos cercanos (65).

En las comunidades complejas de cualquier ecosistema, no todas las especies bacterianas son igual de susceptibles de adquirir plásmidos (69,70), pero sí que se facilita la diseminación entre especies filogenéticamente alejadas incluso en ausencia de la presión selectiva (49,71). La elevada densidad y diversidad microbiana existente en los suelos que facilita el contacto entre las células, los convierte también en ambientes favorables para la aparición de fenómenos de TGH. En 2015, Klümper y colaboradores (6) estudiaron la diversidad de bacterias de una muestra de suelo capaces de adquirir plásmidos conjugativos de amplio espectro de diseminación a

partir de enterobacterias donadoras, encontrando una gran diversidad de bacterias pertenecientes a distintos filos bacterianos capaces de adquirir los plásmidos conjugativos .

Sin embargo, las tasas más altas de transferencia de genes de resistencia a antibióticos se han encontrado entre las bacterias de animales de granja, de alimentos humanos e intestino humano (72). El tracto intestinal está considerado como un hábitat favorable para la diseminación de EGM e incluso se habla de él como “punto caliente” para la TGH (4). La elevada densidad microbiana, que favorece el contacto directo entre las células y la interacción entre bacterias filogenéticamente alejadas, sostenida por un flujo de nutrientes continuo convierte al intestino en un nicho muy favorable para la diseminación de EGM (5).

Las bacterias intestinales pueden convertirse en un arma de doble filo para el hospedador pues, como veremos en los próximos apartados, juegan un papel fundamental en la protección de la salud del organismo, protegiendo de infección de patógenos que usan la colonización intestinal como vía de entrada y diseminación por el organismo; sin embargo, la conversión del tracto intestinal en un reservorio de GRAs preocupa especialmente por el potencial diseminador que adquirirían las bacterias comensales durante una infección por patógenos (73,74).

La microbiota comensal del hospedador está sujeta a presión selectiva durante el uso de antibióticos; durante una infección, una estrecha interacción de los comensales con el patógeno podría facilitar el intercambio de GRAs a través de TGH como se ha descrito en el caso de la resistencia a quinolonas mediada por el plásmido *qnrA* y la resistencia a betalactamasas de espectro extendido *bla_{CTX-M}* (75,76).

Otro factor que contribuye a la rápida diseminación de las resistencias entre poblaciones es el drástico incremento de los desplazamientos humanos en las últimas décadas (65). De hecho, ciertos estudios sugieren que entre un 20% y más del 30% de la microbiota intestinal humana puede presentar resistencia a múltiples fármacos en ausencia de poca o ninguna exposición a antibióticos (77).

Sin embargo, todavía se desconoce en gran medida qué bacterias intestinales son más susceptibles de adquirir, conservar y transmitir los elementos genéticos móviles *in vivo* y qué factores promueven dicha diseminación, preguntas a las cuales intentaremos dar respuesta en este trabajo.

1.5.1. Microbiota intestinal

El conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, protozoos y virus) que residen en el interior del tracto intestinal de los metazoos, incluidos los mamíferos, reciben el nombre de microbiota intestinal. Esta microbiota varía su composición según la especie en la que residen, la región ambiental, la edad del individuo, la localización en el tracto intestinal, el tipo de alimentación, el estado de salud y la ingesta de antibióticos, entre otros factores. Por lo que concierne a los objetivos de esta tesis, a partir de ahora nos referiremos básicamente a la parte bacteriana de la microbiota intestinal.

A pesar de que como hemos dicho anteriormente, la composición de la microbiota puede variar entre individuos dependiendo de diversos factores, la microbiota endógena de cada individuo es una población muy estable, resistente a los cambios (homeostasis intestinal) y se considera que ésta es más saludable cuanto mayor es su diversidad y equilibrio entre las especies. En una persona adulta, el tracto gastrointestinal puede albergar entre 500 y 1000 especies de microorganismos (78), siendo mayoritarias las bacterias de los filos Bacteroidetes ($\approx 25\%$) y Firmicutes ($\approx 60\%$). En menor proporción se detectan los filos Proteobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria y Spirochaetes. Un aspecto importante es que la proporción de cada uno de los filos esté equilibrada, por ello se ha establecido el ratio Firmicutes/Bacteroidetes como un parámetro para evaluar el equilibrio de la microbiota intestinal, y su funcionalidad. Por ejemplo, se conoce que en personas ancianas y obesas existe un aumento fisiológico de los Firmicutes (79).

1.5.2. Funciones de la microbiota intestinal

El organismo hospedador no solo tolera la presencia de microbiota en su intestino, sino que existe una relación de interdependencia entre ellos. La microbiota intestinal juega un papel importante en procesos metabólicos, nutricionales, fisiológicos e inmunológicos vinculados con el establecimiento y la preservación de la salud del hospedador (80).

Entre todas esas funciones, y teniendo en cuenta los objetivos de nuestro trabajo, nos centraremos en el papel fundamental de la microbiota intestinal en la defensa del hospedador frente a la infección por patógenos, incluyendo patógenos multirresistentes, además de definir el papel de la microbiota como reservorio de resistencias a antibióticos y posible generador de nuevas cepas patógenas resistentes.

El papel protector de la microbiota frente a patógenos recibe el nombre de “resistencia a la colonización” y sirve tanto para impedir la colonización de patógenos externos como puede ser VRE o *Clostridium difficile*, como para limitar el crecimiento de patógenos oportunistas que se encuentran de forma habitual en el intestino, como es el caso de *E.coli* y otras enterobacterias.

La microbiota intestinal puede aportar resistencia a la colonización de forma indirecta, interaccionando con el sistema inmunitario del hospedador o de manera directa, mediante la producción de sustancias inhibitorias o competición con el patógeno por los recursos nutricionales (Figura 14).

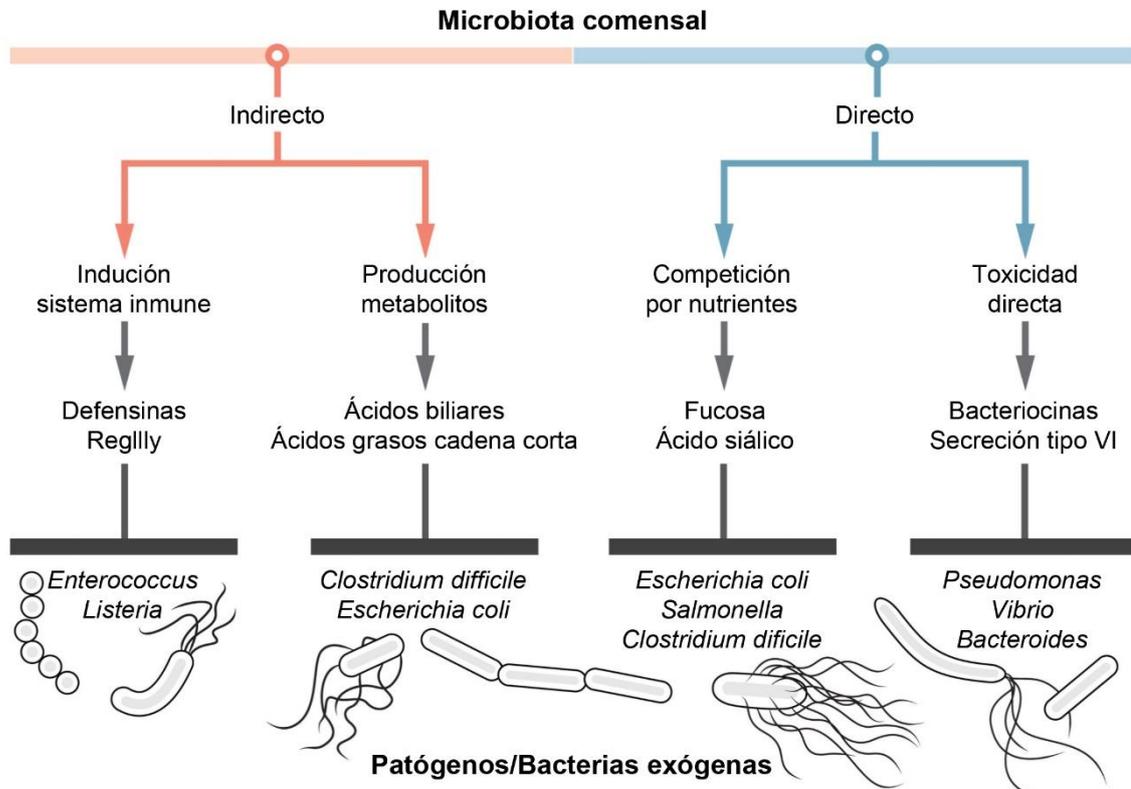


Figura 14. Mecanismos mediante los cuales la microbiota intestinal protege al hospedador de la colonización por bacterias patógenas. Figura adaptada de Pamer E., 2016 (81) con permiso de AAAS.

1.5.2.1. Resistencia indirecta a la colonización

La relación de la microbiota intestinal con el sistema inmunitario es muy compleja. El sistema inmune de la mucosa intestinal necesita encontrar un equilibrio en el que poder ser tolerante con las bacterias de la microbiota para evitar una respuesta inmune sistémica excesiva, pero al mismo tiempo evitar la translocación de éstas y de los patógenos al interior del organismo para evitar infecciones. La propia microbiota intestinal está involucrada en el logro de estos objetivos y para poder estudiar su importancia han sido de gran utilidad los experimentos con ratones libres de gérmenes (Germ Free, GF) en los que se observa como la ausencia de microbiota intestinal tiene profundos efectos en la estructura y desarrollo del sistema inmune incluyendo defectos en el desarrollo del tejido linfóide, timo, bazo y nódulos linfoides, así como en la síntesis de mucus intestinal (82). Pero además de la maduración del sistema inmune, la microbiota intestinal es capaz de inducir respuesta inmune tanto

innata como adaptativa en presencia de patógenos, mejorando la protección del hospedador frente a estos.

Uno de los mecanismos con los que la microbiota mejora la respuesta del hospedador frente a los patógenos es provocando la secreción de péptidos antimicrobianos. De hecho, los ratones GF presentan una disminución de la expresión de péptidos RegIII α , RegIII β por células epiteliales y células de Paneth que juegan un papel importante en el control del crecimiento de patógenos y en la contención de las bacterias en el intestino (83). Zelante y colaboradores (84) mostraron, por otro lado, cómo el metabolismo de la bacteria comensal *Lactobacillus reuteri* es capaz de activar la producción de la interleukina IL-22 protegiendo al hospedador frente a la colonización por *Candida albicans*.

Pero además de estimular el sistema inmunitario innato, la microbiota intestinal también participa de la activación del sistema inmune adaptativo, estimulando la diferenciación de los linfocitos T en los diferentes subgrupos, así como en el desarrollo de los linfocitos B y la producción de anticuerpos.

Estudios con ratones GF colonizados con diferentes especies bacterianas intestinales demuestran el papel de las bacterias en la diferenciación de los linfocitos T incluyendo los linfocitos T helpers y los T reguladores (85). En estudios realizados por Ivanov y colaboradores (86) se demostró que la cantidad de linfocitos Th17 depende de la composición de la microbiota intestinal, pues la misma cepa de ratón tiene diferente número de estos linfocitos dependiendo de su microbiota intestinal. Al parecer serían las bacterias filamentosas segmentadas las responsables de inducir en las células mieloides CD11c⁺ la producción de IL-1 β , una interleucina que potencia la diferenciación de linfocitos Th17 (87).

También se sabe que los ratones GF tienen una menor cantidad de Treg en el intestino delgado (88) lo que provoca que, por ejemplo, ante una infección por *Citrobacter rodentium* tengan una mayor pérdida de peso, inflamación, daño tisular y mortalidad que ratones convencionales en los que la gran mayoría se reponen de la inflamación de forma natural y sobreviven sin problema a la infección. La colonización de los ratones GF con un coctel de cepas de *Clostridium* de los grupos IV, XIVa y XVIII

ha demostrado que restaura el número de Tregs (89). Uno de los mecanismos mediante el cual estas especies bacterianas promueven la diferenciación de linfocitos Treg es debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales, al menos *in vitro*, estimulan la producción de una citoquina fundamental para la diferenciación de los linfocitos Treg (90).

Los AGCC derivados del metabolismo de la microbiota intestinal también juegan un importante papel en la diferenciación de los linfocitos B mediante el aumento de expresión de los genes correspondientes y regulando la acetilación de las histonas en las regiones claves para que expresen receptores de membrana IgA. De este modo, los ratones que reciben una dieta rica en fibra, que es una fuente mayor de producción de AGCC, son más resistentes a la colonización por *C. rodentium* que los animales alimentados con una dieta pobre en fibra (91). Como podemos ver, debido a su papel tanto en la diferenciación de los linfocitos B como de los Treg, podemos considerar a los AGCC derivados del metabolismo de la microbiota intestinal como moléculas clave en la regulación indirecta de las respuestas del sistema inmune adaptativo en el intestino.

Además de la producción de IgA, ciertos miembros de la microbiota pueden influir en la respuesta sistémica de los anticuerpos IgG. Se ha visto que ciertas especies comensales, incluidos miembros de la familia de las enterobacterias, como *E. coli*, son capaces de diseminar desde el intestino en condiciones homeostáticas e inducir la síntesis de anticuerpos IgG específicos, algunos de los cuales reconocen también *Salmonella*, confiriendo protección sistémica frente a una posible infección por este patógeno (92).

1.5.2.2. Resistencia directa a la colonización

Además de interactuar con el sistema inmunitario, la microbiota intestinal también tiene la capacidad de proteger al hospedador frente a infecciones sintetizando ella misma sustancias inhibitorias o compitiendo directamente por el

nicho o los nutrientes que necesitan los patógenos para su colonización y supervivencia.

Las sustancias inhibitorias pueden ser producidas expresamente por la microbiota intestinal en forma de péptidos antimicrobianos que las bacterias secretan al medio, como en el caso de la cepa probiótica *E.coli* Nissle, que secreta microcinas capaces de limitar el crecimiento de *E. coli* invasivas y del patógeno *Salmonella enterica* (93). De igual modo, Kommineni y colaboradores describieron el caso de *Enterococcus faecalis*, capaz de eliminar por completo VRE del intestino de ratones gracias a la expresión de una bacteriocina codificada en el interior de un plásmido (94). Sin embargo, en otras ocasiones, la sustancia inhibitoria se genera debido al metabolismo natural de las bacterias del intestino, como en el caso de los ácidos biliares, cuya conversión de ácidos primarios a secundarios por parte de la microbiota intestinal inhibe el crecimiento de *Clostridium difficile* (95). Por otro lado, la fermentación anaeróbica de la fibra procedente de la dieta por parte de la microbiota produce AGCC que son capaces de inhibir el crecimiento de la cepa patógena *E. coli* O157:H7 *in vitro* (96).

Otros mecanismos conocidos que proporcionan resistencia frente a la colonización por patógenos son la competición por el espacio y/o por nutrientes. Maltby y colaboradores (97) estudiaron el papel protector de dos cepas comensales de *E. coli* (*E. coli* HS y *E. coli* Nissle 1917) en la colonización por la cepa patógena de *E. coli* O157:H7 en ratones previamente tratados con estreptomycin. Cada una de estas cepas, de forma aislada, no es capaz de eliminar al patógeno; además, utilizan diferentes azúcares en su metabolismo, por lo que no compiten entre ellas; sin embargo, si se encuentran juntas, consumen los 5 azúcares que puede utilizar la cepa de *E. coli* patógena impidiendo así su colonización (97).

1.6. Disbiosis

El papel protector de la microbiota que hemos ido comentando pone de manifiesto la importancia de la homeostasis en el organismo. Por eso, circunstancias tales como un tratamiento antibiótico, la ingesta de una dieta pobre en fibra y rica en grasas y azúcares simples, la inflamación intestinal o cualquier otra perturbación puede alterar la composición de la microbiota, proceso que conocemos con el nombre de disbiosis y que puede resultar en una pérdida de su función protectora.

Al desaparecer la resistencia a la colonización, patógenos oportunistas como VRE o las enterobacterias son capaces de alcanzar niveles intestinales lo suficientemente elevados como para que se promueva su diseminación al torrente sanguíneo, desde donde pueden alcanzar diferentes órganos y suponer un verdadero problema para la vida del paciente (9). De hecho, existen estudios como el de Woerther y colaboradores en los que se observa como los pacientes con mayores niveles de enterobacterias resistentes a betalactámicos a nivel intestinal son los que tienen un mayor riesgo de desarrollar una bacteriemia causada por estas bacterias (9). Además, altos niveles de colonización intestinal correlacionan también con una mayor diseminación del patógeno entre pacientes (98).

1.6.1. Disbiosis causada por antibióticos

Los antibióticos se usan para tratar infecciones con microorganismos patógenos, pero incluso los de menor espectro no afectan exclusivamente al patógeno, sino que alteran en mayor o menor medida la microbiota según el tipo de antibiótico.

En un estudio publicado por Panda y colaboradores (99) se investigaron los efectos a corto plazo de las fluoroquinolonas y betalactámicos en la composición de la microbiota intestinal observando que ambos antibióticos disminuían significativamente la diversidad microbiana en el intestino humano. Ambos antibióticos modificaban el ratio Firmicutes/Bacteroidetes comentado con

anterioridad, pues causan una disminución de los primeros y un aumento de los segundos.

Un estudio realizado por nuestro grupo demostró que el tratamiento con vancomicina en pacientes afecta a la composición de la microbiota disminuyendo los niveles de bacterias del filo Bacteroidetes y promoviendo la expansión de Proteobacteria y Fusobacteria (100). Además del efecto a corto plazo, este estudio demostró que estos efectos en la microbiota perduraban durante varios meses tras el cese del tratamiento antibiótico (100). Por otro lado, cambios similares a los observados en los pacientes fueron detectados en ratones que habían recibido vancomicina. Posteriormente se investigó, utilizando el modelo de ratón, si los cambios producidos por vancomicina promovían la colonización intestinal por patógenos multirresistentes. Para ello se inocularon con VRE, vía oral, tanto ratones tratados con vancomicina como ratones sin tratamiento antibiótico a modo de control. Los ratones no tratados fueron completamente resistentes a la colonización por VRE, mientras que los ratones tratados con vancomicina se colonizaron con niveles muy elevados de VRE (aproximadamente 10^9 UFC/g de heces). Más aun, en este estudio se demostró que, tras el cese del tratamiento antibiótico, los ratones seguían siendo susceptibles a la colonización por el patógeno y que el grado de susceptibilidad dependía del grado de disbiosis permanente generada por el antibiótico en el intestino (101).

Ya hemos visto como los ratones tratados con vancomicina son susceptibles a la colonización por VRE. De modo similar, tras la administración de cefoperazona, la microbiota murina se altera de forma que aumentan los niveles de azúcares disponibles como manitol y sorbitol, promoviéndose la colonización intestinal por *C. difficile* que puede utilizar estos azúcares como fuente de carbono (102).

Además de en ratones, se ha observado que el tratamiento con antibióticos en humanos también promueve la colonización por este tipo de patógenos. Donskey y colaboradores detectaron que el tratamiento de pacientes con antibióticos que presentan actividad frente a bacterias anaeróbicas es capaz de causar un incremento en los niveles de VRE intestinales (2). Por otro lado, pacientes que han tenido una

infección por *C. difficile*, suelen tener infecciones recurrentes tras el tratamiento con vancomicina o metronidazol, dos antibióticos que alteran de manera considerable la microbiota intestinal (103).

Además del efecto de los antibióticos en la composición microbiana (i.e. Bacteroides, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, etc.) otros estudios han investigado el efecto del tratamiento antibiótico no solo en la composición, sino en la diversidad funcional de la microbiota gracias al desarrollo de las técnicas -ómicas (metabolómica, metagenómica, metatranscriptómica y metaproteómica) para el estudio de comunidades. Por ejemplo, en 2013, Pérez-Cobas y colaboradores (104) fueron de los primeros grupos en demostrar que el tratamiento con betalactámicos produce alteraciones metabólicas en los perfiles proteicos detectados en las heces de los pacientes, además de cambios en la composición microbiana.

1.6.2. Disbiosis producida por la dieta

La dieta tiene diferentes efectos en la estructura de la microbiota intestinal. Existen cada vez más evidencias que apuntan a que el reciente cambio de estilo de vida hacia dietas ricas en grasas y azúcares simples tiene importantes efectos en las características taxonómicas, genéticas y metabólicas de nuestra microbiota (79,105). Estudios recientes han demostrado que estas dietas pueden inducir tanto efectos a corto plazo, que serían reversibles, como también efectos irreversibles a largo plazo (19,106).

Uno de los primeros estudios que evidenció el efecto de la dieta en la composición de la microbiota humana, comparaba la microbiota de las heces de niños italianos con la de los niños de un área rural africana (107). Los análisis mostraron una disminución de Firmicutes y enterobacterias (entre ellas *Escherichia* y *Shigella*) y una mayor cantidad de AGCC en los niños africanos en comparación con los italianos. Además, el tipo de *Bacteroides* encontrado en los niños italianos se correlaciona con el consumo de proteínas animales y una variedad concreta de aminoácidos y grasas saturadas; elementos típicos de un estilo de vida occidental.

La llamada dieta occidental (DO), se caracteriza por un elevado contenido en proteínas (derivadas de carnes grasas procesadas), grasas, azúcares simples (incluyendo jarabe de fructosa contenido en las bebidas carbonatas) y una reducción del consumo de frutas y verduras que contienen fibras compuestas por carbohidratos complejos (los cuales son consumidos por numerosas especies bacterianas anaeróbicas del intestino) (108). Esta dieta puede, por tanto, producir alteraciones considerables en la microbiota intestinal, eliminando ciertas especies comensales, lo cual puede derivar en la reducción significativa de la diversidad microbiana (11). Consecuentemente, esta dieta se ha asociado con diversas enfermedades, incluyendo enfermedades metabólicas como la obesidad, la diabetes, el asma y la enfermedad inflamatoria intestinal en aquellos países en los que se está adaptando un estilo de vida occidental (109-111). Entre otras consecuencias, los cambios en la microbiota inducidos por la DO aumentan el riesgo de padecer la enfermedad de Crohn debido a un aumento de la colonización intestinal con *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) que promueve la inflamación intestinal (112,113).

Teniendo en cuenta el importante papel de la microbiota en la protección frente a patógenos, es posible que las drásticas alteraciones intestinales inducidas por la DO tengan un impacto en la colonización intestinal y diseminación de patógenos multirresistentes. Curiosamente, aunque se desconoce el mecanismo exacto, la obesidad ha sido identificada como un factor de riesgo en el desarrollo de infecciones en pacientes hospitalizados (114). Por otro lado, un análisis metagenómico identificó que los niños obesos contienen mayores niveles de patógenos resistentes a antibióticos en sus heces y que la restauración de su microbiota mediante trasplante fecal disminuye los niveles de estos patógenos (115).

Teniendo en cuenta estos estudios y los cambios drásticos que induce la DO en la microbiota, hipotetizamos que la alteración de la microbiota causada por la DO puede promover la colonización de patógenos resistentes a antibióticos, incluido VRE.

1.6.3. Disbiosis producida por inflamación

Diversos estudios han relacionado la inflamación del intestino con disbiosis de la microbiota intestinal. En 2007, Lupp y colaboradores (10) demostraron que tras la infección de ratones con *C. rodentium*, que produce inflamación intestinal, se produce una clara reducción del número total de bacterias comensales, mientras que la infección con *Campilobacter jejuni*, un patógeno comensal que no induce inflamación, no provocaba estos cambios en la microbiota. Además, los autores demostraron que la inflamación promueve la expansión de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, patógenos oportunistas humanos.

Curiosamente, algunos patógenos como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pueden aprovechar la respuesta inflamatoria del hospedador en su propio beneficio. En un estudio publicado por Stecher y colaboradores (116) se observó cómo el patógeno es capaz de vencer la resistencia a la colonización induciendo inflamación y la correspondiente disbiosis de la microbiota intestinal. Sin embargo, una cepa no patógena de *S. typhimurium* no era capaz de producir inflamación ni de colonizar el intestino del ratón. La colonización con *S. typhimurium* provoca una expansión de proteobacterias intestinales, entre las cuales *E. coli* alcanza niveles especialmente elevados sugiriendo que otras especies bacterianas filogenéticamente cercanas a *S. typhimurium* podrían beneficiarse de la inflamación causada por el patógeno.

1.7. Restauración de la microbiota (Trasplante fecal)

Como hemos comentado, cualquier alteración de la microbiota puede facilitar la colonización de patógenos en el intestino, por eso, cada vez existen más estudios interesados en posibles estrategias terapéuticas para reestablecerla, entre las que se incluyen la administración de probióticos o el trasplante fecal (TF) (Figura 15).

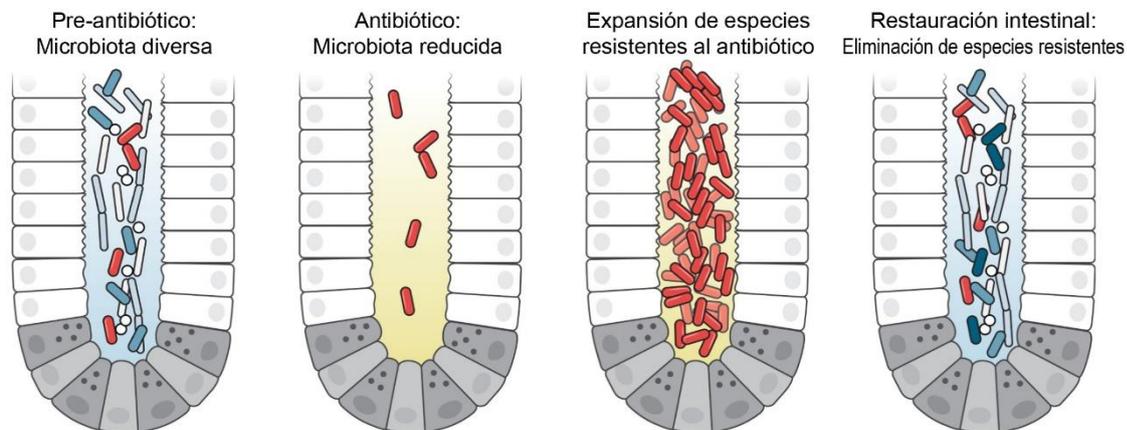


Figura 15. Restauración de la microbiota intestinal y por tanto de su capacidad de resistencia a la colonización mediante la administración de especies comensales bacterianas. La disbiosis producida por los efectos de un tratamiento antibiótico y la consecuente pérdida de resistencia a la colonización puede ser corregida mediante la administración de especies comensales bacterianas. Adaptado de Pamer E., 2006 con permiso de AAAS.

Entendemos por probióticos, especies microbianas concretas que, tras su administración, confieren un beneficio al hospedador; mientras que el TF implica el trasplante de la comunidad microbiana completa de un donante sano a uno aceptor (81).

En el año 2014, el TF fue reconocido como una de las diez mejores innovaciones médicas por la Cleveland Clinic de Estados Unidos (117). Hoy en día, su principal aplicación reside en el tratamiento de pacientes con diarreas recurrentes causadas por una infección por *C. difficile*, resolviendo positivamente un 90% de los casos (118).

Existen otras patologías donde la transferencia de materia fecal tiene un gran potencial terapéutico: la enfermedad inflamatoria intestinal, la obesidad, el síndrome metabólico, las enfermedades autoinmunes, las alergias, el síndrome de fatiga crónica

y algunas enfermedades neuropsiquiátricas. Para todas estas enfermedades se han publicado estudios con transferencia de materia fecal, aunque los resultados no han sido tan exitosos como en la diarrea por *C. difficile* (119-121).

Existen cada vez más bacterias multirresistentes, que como ya hemos comentado están asociadas con un aumento de la morbilidad y mortalidad, para las cuales no existe un tratamiento eficaz de descolonización. Es el caso, por ejemplo, de las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido o las enterobacterias productoras de carbapenemasas. El TF ha emergido recientemente como una potente estrategia de descolonización de este tipo de patógenos del tracto intestinal. Por el momento se ha descrito la erradicación de enterococos resistentes a vancomicina, estafilococos resistentes a meticilina y *Klebsiella* spp. productora de carbapenemasas (122).

Los efectos secundarios de este procedimiento suelen ser escasos y poco relevantes. Sin embargo, existe todavía mucha incertidumbre sobre la factibilidad, efectividad y seguridad de estas aproximaciones especialmente a largo plazo (122). Aunque los donantes deben ser personas sanas, su microbiota puede contener bacterias o virus con propiedades patológicas e infecciosas no caracterizadas, y el efecto global del trasplante puede tener una dinámica impredecible (123). Además, es posible que una bacteria cambie su comportamiento por completo al cambiar de ambiente hospedador debido al genotipo, la dieta o la microbiota residual, haciendo que pase de ser una bacteria beneficiosa a un patobionte proinflamatorio.

1.8. Estudios de TGH

Hasta la fecha, se han utilizado diferentes metodologías para estudiar la TGH. Cabe destacar que existen dos tipos fundamentales de aproximaciones, los llamados análisis retrospectivos, que estudian eventos de TGH ocurridos en el pasado a través de la comparación filogenética de genes o proteínas con funciones similares evidenciando la fuerza evolutiva de los mecanismos de transferencia (124) y los

análisis prospectivos que buscan estudiar la TGH *in situ* mediante el trabajo experimental.

Para los trabajos prospectivos y dado que los plásmidos, como ya hemos comentado, son los principales EGM responsables de la transmisión de GRAs, se ha recurrido en numerosas ocasiones al marcaje de estos para poder rastrear su diseminación utilizando un medio selectivo para la detección de transconjugantes (TC).

Sin embargo, este tipo de aproximación presenta ciertas limitaciones. Por un lado, la dificultad de diferenciar los eventos TC de la expansión clonal de las bacterias que adquieren el plásmido por herencia vertical (124) podría generar falsos positivos y distorsionar los resultados de eficiencia de conjugación. Por otro lado, en muchas ocasiones, los experimentos realizados son modelos simplificados en los que se estudia la transferencia *in vitro* de EGM entre una bacteria donante y una única bacteria aceptora, lo que difiere considerablemente de las condiciones reales estructurales y espaciales en las que ocurriría la transferencia *in vivo* (125). Pero sin lugar a duda, la principal limitación de estos estudios reside en el hecho de que la identificación de transconjugantes requiere el cultivo selectivo de las bacterias para diferenciarlas de las bacteriasceptoras. Sin embargo, la mayoría de las bacterias de la microbiota intestinal no pueden ser cultivables *in vitro* o su cultivo presenta una gran complejidad (126) por lo que probablemente la frecuencia de TGH haya sido subestimada con estos métodos y la relevancia de las conclusiones obtenidas sea a veces cuestionable.

Estos inconvenientes llevaron a la utilización de genes reporteros independientes de los métodos de cultivo como son los genes de fluorescencia. Además, la combinación de los genes de fluorescencia con la citometría de flujo, que permite un conteo directo de los eventos fluorescentes y ofrece incluso la posibilidad de poder separar poblaciones bacterianas, ha hecho que estos se conviertan en una potente herramienta para el estudio de la TGH.

1.9. Genes de Fluorescencia

1.9.1. Proteína verde fluorescente (GFP)

El uso de proteínas fluorescentes como reporteras se ha incrementado considerablemente, constituyendo un pilar básico en la investigación biológica y biomédica. De entre todas, la más conocida y utilizada es la proteína verde fluorescente (GFP), aislada de la medusa *Aequorea victoria*, que emite fluorescencia verde al ser iluminada con luz ultravioleta (127).

Desde su descubrimiento, su uso en la investigación biológica se ha extendido enormemente y tanto ésta como proteínas similares a GFP (GFP-like proteins) pueden ser utilizadas para analizar expresión, localización, movimiento e interacción de proteínas facilitando el estudio de procesos celulares complejos, así como en numerosas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Debido a sus numerosos usos, no tardaron en aparecer variantes de esta proteína con propiedades mejoradas (intensidad de fluorescencia, solubilidad, fotoestabilidad, plegamiento, etc.) para su utilización en el laboratorio.

Debido al interés que presenta en nuestro trabajo, destacamos el uso que dieron Soren y colaboradores (128) a la proteína GFP utilizándola como marcador de plásmidos conjugativos para poder detectar TC mediante citometría de flujo en bacterias de suelo y desarrollando así un método de estudio de TGH independiente del cultivo celular. El plásmido conjugativo objeto de estudio fue modificado de manera que contuviera el gen que codifica para GFP. Además, un represor fue integrado en el cromosoma de las bacterias donadoras para reprimir la fluorescencia en éstas, de forma que no interfirieran con la identificación de las bacterias que adquieren el plásmido por conjugación (128). Una vez desarrollada, esta metodología no es únicamente aplicable a estudios de TGH entre un donante y aceptor concretos, sino que también ha sido utilizada para el estudio de la diseminación de plásmidos portadores de resistencias a antibióticos a una población microbiana compleja. Klümper y colaboradores (6) marcaron con GFP tres plásmidos conjugativos diferentes, de amplio espectro de diseminación, portadores de genes de resistencia a antibióticos y haciendo uso de las técnicas de separación celular por citometría de flujo acopladas a

la secuenciación masiva, pudieron mapear la diversidad de bacterias capaces de adquirir dichos plásmidos en bacterias del suelo. Sus resultados muestran que la población aceptora es diferente para cada uno de los plásmidos estudiados detectándose transconjugantes en más de 300 OTUs (unidades taxonómicas operacionales) diferentes, algunas filogenéticamente muy alejados a la cepa donadora y algunas de ellas muy difícilmente cultivables, lo que confirma que esta metodología mejora en gran medida los resultados que pueden obtenerse mediante técnicas tradicionales de cultivo. Además, se observó que todos los plásmidos se transferían a bacterias pertenecientes al filo Proteobacterias, entre las que se encontraban bacterias de la familia de las enterobacterias, la cual incluye posibles patógenos oportunistas de humanos (6).

Pese a las numerosas aplicaciones que podemos encontrar para la proteína GFP, su principal limitación reside en la necesidad de la presencia de oxígeno ambiental para su fluorescencia. Tras su transcripción y traducción, la proteína GFP necesita un paso final de maduración de su fluoróforo que comprende una serie de reacciones bioquímicas entre las que se incluye un paso de oxidación (129). El requerimiento obligado de oxígeno para que este paso de oxidación pueda llevarse a cabo imposibilita su uso para el estudio de transferencia de plásmidos en ambientes anaeróbicos tales como el intestino.

1.9.2. Proteínas fluorescentes basadas en el mononucleótido de flavina (FbFP)

En respuesta a la restricción de uso de las proteínas GFP-like exclusivamente en ambientes aeróbicos, aparecieron en 2007 las llamadas proteínas fluorescentes basadas en el mononucleótido de flavina (proteínas FbFP) cuya señal fluorescente es independiente de los niveles de oxígeno (7).

Para su construcción, Drepper y colaboradores utilizaron como punto de partida el fotorreceptor azul YtvA de *Bacillus subtilis* que de forma natural está implicado en una ruta de señalización que controla la respuesta al estrés ambiental y emite fluorescencia en ausencia de oxígeno (7). Esta proteína fue posteriormente

modificada por mutagénesis dirigida para aumentar su expresión e intensidad de fluorescencia, pero manteniendo intacta su estabilidad.

Para testar la fluorescencia *in vivo*, los autores introdujeron en el interior de la bacteria anaeróbica facultativa *Rhodobacter capsulatus* un plásmido con el inserto que codifica, bien para la proteína fluorescente FbFP, bien el mismo plásmido con un inserto que codifica para una proteína de la familia de las GFP pero que emite fluorescencia amarilla (YFP) o bien el plásmido sin inserto como control negativo. Las cepas obtenidas fueron crecidas tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Utilizando técnicas de inmunodetección y microscopía confocal para observar el efecto del oxígeno y la acumulación de proteína fluorescente observaron que, en presencia de oxígeno, se detectaba fluorescencia tanto de la proteína FbFP como de la YFP, sin embargo, en un ambiente anaeróbico, aunque se seguía produciendo la misma cantidad de proteína YFP, únicamente se detectaba la fluorescencia procedente de FbFP (7).

Estas proteínas reporteras ofrecen un gran potencial para una variedad de diferentes aplicaciones desde rastreo masivo de bacterias mediante citometría de flujo y separación celular, detección de toxicidad basada en biosensores o desarrollo de terapias con bacterias anaeróbicas como agentes antitumorales (7) y pensamos que serían interesantes para ayudarnos a estudiar TGH en el ambiente anaeróbico intestinal.

2. Objetivos

Con el objetivo principal de estudiar la diseminación de elementos genéticos móviles (EGM) en la microbiota intestinal y su efecto en la generación de cepas resistentes a antibióticos, se definieron 3 objetivos principales cada uno con sus respectivos subobjetivos:

Objetivo 1: Desarrollar una nueva metodología para estudiar la diseminación de EGM en la microbiota intestinal:

- 1.1. Desarrollo de un plásmido conjugativo cuya diseminación pueda ser trazada mediante fluorescencia en condiciones anaeróbicas.
- 1.2. Estudio de la diseminación de EGM *ex vivo* utilizando herramienta desarrollada en el primer subobjetivo.
- 1.3. Estudio de la diseminación de EGM *in vivo* utilizando la herramienta desarrollada en el primer subobjetivo y un modelo de ratón.

Objetivo 2: Estudiar la diseminación de EGM y adquisición de resistencias en pacientes mediante el análisis de genomas de aislados clínicos multirresistentes:

- 2.1. Aislamiento e identificación de pares de cepas clínicas de enterobacterias que hayan adquirido resistencia a antibióticos.
- 2.2. Secuenciación del genoma completo de aislados clínicos seleccionados.
- 2.3. Análisis de los genomas obtenidos con el fin de identificar mecanismos de resistencia y adquisición de EGM.

Objetivo 3: Estudio de factores externos (i.e. dieta occidental vs antibióticos) que puedan promover la colonización intestinal por patógenos, lo que podría facilitar la transmisión de EGM entre microbiota y el patógeno.

- 3.1. Estudio de los efectos de la dieta occidental (DO) vs antibióticos en la colonización por patógenos multirresistentes utilizando un modelo de ratón.

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

- 3.2. Estudio de los cambios en la microbiota intestinal inducidos por la DO y su efecto en la colonización por patógenos multirresistentes.
- 3.3. Estudio de la persistencia de los cambios en la microbiota intestinal inducidos por la DO y su efecto en la colonización por patógenos multirresistentes.
- 3.4. Estudio de la heredabilidad de los cambios en la microbiota intestinal inducidos por la DO y su efecto en la colonización por patógenos multirresistentes.
- 3.5. Análisis de los efectos de la restauración microbiana mediante trasplante fecal en la resistencia a la colonización por patógenos multirresistentes.

3. Material y Métodos

3.1. Cepas y Medios de cultivo utilizados durante el estudio

En la tabla M5 se resumen las cepas utilizadas para el estudio (página 106).

3.1.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Para el cultivo rutinario de *E. coli* en el laboratorio se utilizó medio Luria Bertani (LB) en su forma líquida o sólida, suplementado con agar.

Los cultivos se crecieron *overnight* (*o.n.*) a 37 °C, excepto en los casos de contener el plásmido termosensible pKD46-Gm (130) en los que la temperatura seleccionada fue 28 °C. Los cultivos líquidos se crecieron en agitación a 150 revoluciones por minuto (rpm).

Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a los medios de cultivo para hacerlos selectivos en las siguientes concentraciones: ampicilina (amp) 100 µg/ ml, kanamicina (kan) 50 µg/ ml, cloranfenicol (cm) 10 µg/ ml, estreptomycin (stp) 100 µg/ ml, gentamicina 10 µg/ ml, trimetoprim 20 µg/ ml .

Para el cultivo de la microbiota intestinal murina o humana se utilizó el medio de cultivo Columbia Agar Sangre (CBA) y se incubaron a 37 °C durante 6 días en condiciones anaeróbicas.

3.1.2. *Enterococcus faecium* (*E. faecium*)

Los cultivos rutinarios de *E. faecium* Aus0004 (VRE) se realizaron en medio Infusión Cerebro Corazón (Brain Heart Infusion, BHI). Para su detección en heces murinas se utilizó el medio sólido Agar Bilis Esculina (BEA) suplementado con 10 µg/ ml de amp y 8 µg/ ml de vancomicina.

3.1.3. Enterobacterias clínicas

Muestras perianales de pacientes con leucemia aguda ingresados en el Hospital La Fe de Valencia fueron recogidas semanalmente y transportadas en medio Cary Blair hasta los laboratorios de microbiología del hospital. El medio Cary Blair tiene un bajo potencial de oxidación-reducción lo que alarga la supervivencia de las especies bacterianas. El periodo de recogida fue entre Abril de 2014 y Junio de 2016.

El personal del departamento de microbiología del Hospital La Fe de Valencia se encargó de cultivar las muestras en ESBL Brilliance Agar, un medio cromogénico selectivo para la detección de enterobacterias y fermentadores gram negativos multirresistentes, y procedieron a la identificación de las colonias detectadas y a la caracterización de su patrón de resistencia a los antibióticos. La identificación de las colonias detectadas fue comprobada mediante la tecnología MALDITOF MS. Para cada aislado detectado, se analizó mediante Vitek y disco-difusión su sensibilidad o resistencia para los principales antibióticos que se utilizan en la clínica, obteniendo así su patrón de resistencia, de acuerdo con la Guía de Estándares Clínicos y de Laboratorio (2016). Los antibióticos testados fueron:

- Penicilinas: ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam.
- Carbapenémicos: imipenem, ertapenem, meropenem.
- Cefalosporinas: cefuroxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona.
- Monobactámicos: aztreonam.
- Fluoroquinolonas: ciprofloxacina.
- Aminoglucósidos: amikacina, gentamicina, tobramicina.
- Sulfonamidas: Trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol).
- Colistina.

Aquellos aislados bacterianos, obtenidos de un mismo paciente en un periodo inferior o igual a dos semanas, y en los que se detectó una adquisición de resistencia a alguno de los antibióticos testados, fueron seleccionados para extraer su ADN (ver apartado 3.3.4.) y secuenciar su genoma (ver apartado 3.16.2.) con el fin de hacer un estudio de la evolución a corto plazo de las enterobacterias multirresistentes (EMR) *in vivo*.

3.2. Plásmidos conjugativos utilizados en el estudio

Existen cientos de plásmidos conjugativos que contienen genes de resistencia a antibióticos. Según su tipo de regulación, estos plásmidos se clasifican en los llamados grupos de incompatibilidad. Los plásmidos conjugativos que utilizamos en este estudio son el R388, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncW y el plásmido RP4 del grupo IncP. La conjugación de los plásmidos IncW, al igual que los del grupo IncP requiere una superficie sólida para llevarse a cabo, esto condiciona la metodología que aplicamos a la hora de realizar los experimentos de conjugación *in vitro* y *ex vivo* (ver apartados 3.10. y 3.11.).

3.2.1. Plásmido R388

Entre todos los plásmidos conjugativos naturales estudiados, los plásmidos del grupo IncW son los que tienen menor tamaño, por lo que son considerados como el “genoma mínimo” de los plásmidos conjugativos. Esta característica, unida con su amplio espectro de diseminación y su también amplio espectro de expresión de genes de resistencia a antibióticos los hace apropiados para el estudio de la diseminación de plásmidos a bacterias de la microbiota propuesto en esta tesis.

El plásmido R388 fue aislado originalmente de *E. coli* (131), expresa resistencia a trimetoprim y sulfonamidas y podemos encontrarlo en 2-3 copias por célula. Su genoma (nº acceso GenBank: BR000038) contiene 33926 pares de bases. Los genes del plásmido R388, como los de otros plásmidos conjugativo, pueden dividirse en módulos diferentes según su función y localización en el genoma, tal y como se observa en la figura M1 donde podemos ver dichos módulos remarcados en distintos colores.

Nuestro cassette para la expresión de fluorescencia fue introducido en el plásmido conjugativo R388 entre el origen de transferencia del plásmido (OriT) y el gen *stbA* implicado en la estabilidad del mismo. La introducción se llevó a cabo en esta

localización debido a que es un punto de integración que ha sido utilizado para la inserción de genes de resistencia, dando lugar a plásmidos derivados del R388, por lo que esperábamos que no se vería afectada ni la replicación ni la capacidad de conjugación del plásmido.

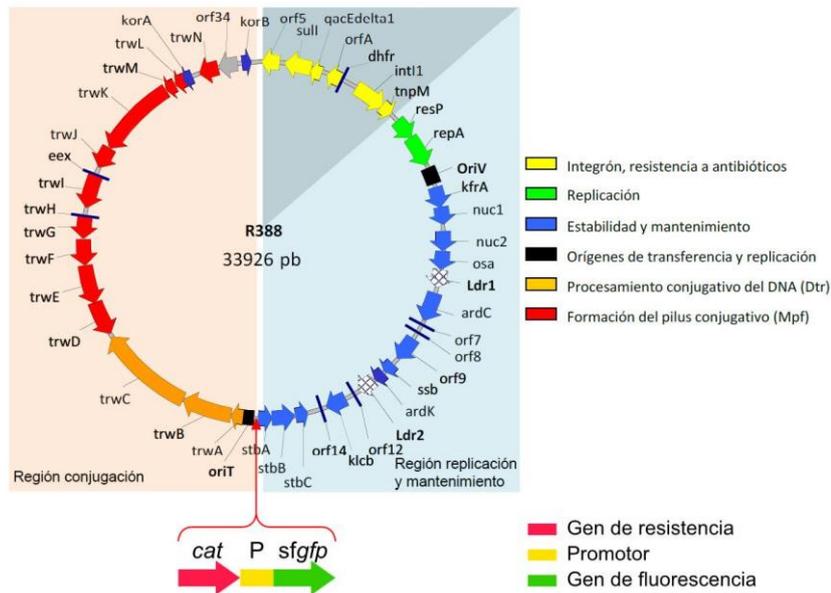


Figura M1. Mapa genético del plásmido conjugativo R388. Se representan los distintos módulos genéticos agrupados en el plásmido según la función que realizan, marcados con colores diferentes y con una flecha que indica el sentido de la transcripción. En la leyenda se detalla el código de colores que se ha utilizado. El cassette con el gen que expresa fluorescencia fue introducido entre el origen de transferencia del plásmido (*oriT*) y un gen implicado en la estabilidad de este (*stbA*). Modificado de Fernandez-Lopez, et al., 2006 (132).

3.2.2. Plásmido RP4

Los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncP son también plásmidos que tienen un amplio espectro de hospedador, lo que significa que pueden conjugarse y establecerse en la mayoría de bacterias Gram negativas, aunque también se ha visto transferencia a levaduras (133) y otras células eucariotas (134).

El plásmido RP4 (número acceso GenBank: BN000925.1) fue aislado originalmente de cepas clínicas de *Klebsiella aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* en 1969 (135). Tiene un genoma de 60096 pb y encontramos alrededor de 4-7 copias por célula. Presenta resistencia a tetraciclina, ampicilina y kanamicina.

El mapa de la figura M2 representa el plásmido RP4. Al igual que ocurría con el plásmido R388, los genes se encuentran agrupados según la función en la que están implicados. En este caso, la construcción para la expresión de fluorescencia fue introducida en sustitución de 2100 pb del plásmido, correspondientes al gen de resistencia a tetraciclina y su represor. La sustitución del represor era necesaria puesto que, si el plásmido continúa expresando el represor, no podríamos visualizar el efecto de algunos de los promotores que queremos testar (Ptet y Ptet2) que son reprimidos por dicho represor.

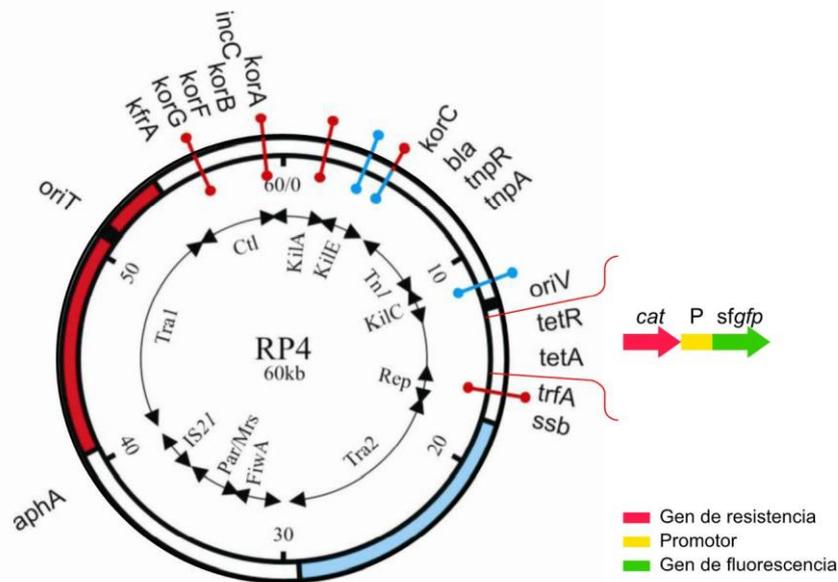


Figura M2. Mapa genético del plásmido conjugativo RP4. El círculo más externo muestra algunos loci seleccionados y el interno muestra bloques de genes relacionados o distintos elementos genéticos. La regulación de los genes implicados en la replicación, transferencia y estabilización del plásmido se encuentra coordinada por la agrupación de estos en operones. El cassette con el gen que expresa fluorescencia será introducido en sustitución de los genes de resistencia a tetraciclina (*tetA*) y su represor (*tetR*). Modificado de Balzer et al., 1992 (136).

3.3. Extracción de ADN

3.3.1. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen, compuesto por unas membranas de sílice capaces de unir hasta 20 µg de ADN. Brevemente, primero se lisan las células y se hace pasar ese lisado

a través de las membranas de sílice que atrapan las moléculas de ADN. Tras una serie de lavados para eliminar impurezas, el ADN plasmídico es eluído en un pequeño volumen de agua ultrapura. El alto grado de pureza del ADN obtenido permite que estos plásmidos puedan ser utilizados inmediatamente después de su extracción para cualquier otro tipo de reacciones (i.e. PCR, digestión, transformación).

3.3.2. Extracción de ADN a partir de muestras fecales

La extracción de ADN de las muestras fecales de ratón se realizó mediante el kit comercial QIAmp ADN Stool Mini Kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante, con una modificación para ayudar a la lisis celular inicial que ya ha sido utilizada previamente en nuestro grupo (137). Esta modificación consiste en añadir, tras el tampón de lisis, 500 μ l de perlas de vidrio de 150 μ m de diámetro a cada muestra y agitar con vórtex durante 5 min a máxima velocidad para ayudar a romper mecánicamente la pared bacteriana.

3.3.3. Extracción de ADN de las bacterias aisladas mediante la técnica de separación celular

La extracción de ADN de las células separadas por citometría de flujo se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Sorensen utilizando el kit de extracción Gene Purge Direct de Nimagen. La extracción se realizó con este kit ya que el número mínimo de células necesario para poder realizar una extracción de ADN exitosa con este kit es muy bajo: de 10000 células, lo que corresponde al número de células que se obtienen en algunas de las purificaciones realizadas por la técnica de "sorting".

De forma resumida, se centrifuga el volumen de células recogido del separador celular a 10000 rpm durante 40 min y siguiendo las indicaciones del fabricante, el pellet se resuspende con la solución del kit alternándose unos ciclos de subida y bajada de temperatura para romper las membranas celulares y permitir la salida del ADN. Para terminar, una centrifugación breve permitirá que la mezcla quede separada en

dos fases, una solución inferior blanquecina que contiene los restos celulares y una transparente superior donde está el ADN de la que cogeremos 5 μL para realizar la amplificación y posterior secuenciación del gen 16s rRNA.

3.3.4. Extracción de ADN de los aislados clínicos multirresistentes

La extracción de ADN de los aislados clínicos multirresistentes se llevó a cabo con la ayuda del sistema NucliSENS easyMAG[®] de bioMérieux. Este sistema utiliza unas partículas de sílice magnéticas que retienen los ácidos nucleicos de los cultivos lisados durante los diferentes lavados. Finalmente, mediante el aumento de la temperatura, las partículas de sílice liberan el ADN y un mecanismo imantado permite la separación de las partículas y la elución del material genético. Este sistema ya había sido utilizado con éxito en nuestro grupo para la extracción de ADN de enterobacterias (138).

3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Por cada muestra que se deseó amplificar se preparó una reacción de PCR de 25 μL que contenía: 0,1-1 ng de ADN molde purificado, 12,5 μl del tampón 2x KAPA HiFi HotStart ADN polymerase (conteniendo 0,5 U de enzima polimerasa, 0,3 mM de cada dNTP y 2,5 mM de MgCl_2 por cada 25 μl de reacción, además de estabilizadores del enzima), 0,3 μM de cada uno de los oligonucleótidos y agua autoclavada hasta completar los 25 μl de la reacción. Los oligonucleótidos que se han utilizado a lo largo de todo el estudio están recogidos en la tabla M4 (página 102).

Utilizamos la polimerasa KAPA HiFi HotStart con las condiciones recogidas en la tabla M1 ya que al poseer actividad de corrección de errores su fidelidad es 100 veces mayor que la de otras polimerasas. Además, es capaz de amplificar fragmentos con elevados contenidos en GC o AT y fragmentos de gran tamaño, lo que resulta fundamental en el caso de nuestras construcciones, compuestas por más de un gen.

Tabla M1. Condiciones de PCR recomendadas por la casa comercial, y utilizadas en nuestro estudio.

Fases	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	98 °C	20 s	
Hibridación	60-75 °C	15 s	15-35
Extensión	72	15-60 s/kb	
Extensión final	72	1 min/kb	1

3.4.1. PCR fusión

Para unir dos fragmentos de ADN distintos se utilizó la técnica de PCR fusión. Para ello se realizaron dos PCRs primarias con extremos solapantes. Los fragmentos obtenidos se unieron en una segunda PCR mediante cebadores de los extremos y los dos productos de las PCRs primarias como molde para amplificar el fragmento completo (Figura M3).

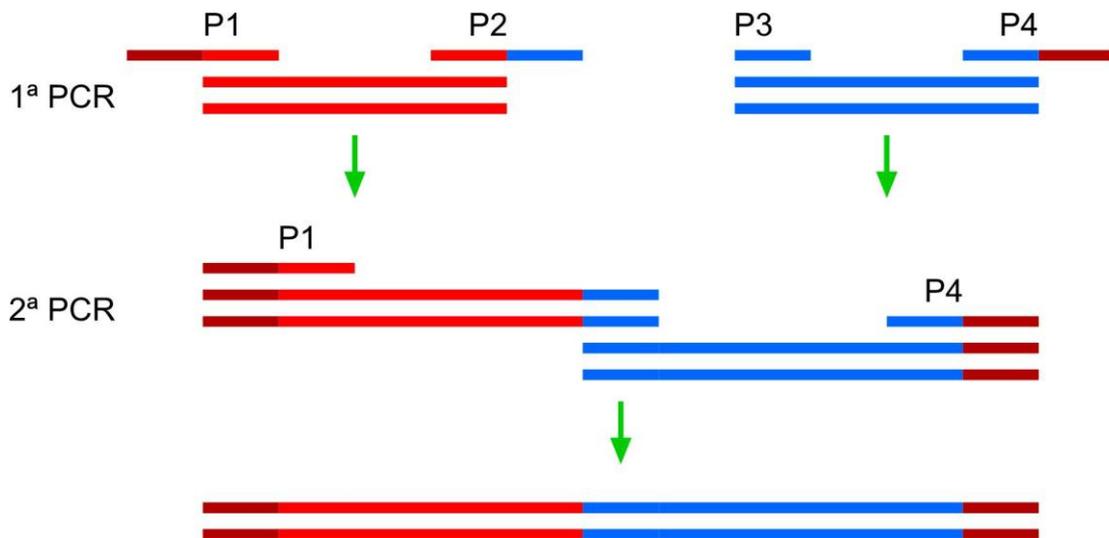


Figura M3. Esquema de la PCR fusión. Se amplifican los dos fragmentos de ADN de interés por separado, añadiendo con ayuda de los oligonucleótidos una región solapante. En rojo y azul se representan los amplificadores simples, y los cebadores utilizados están marcados como P1-P4. En nuestro caso P2 añade a uno de los amplificadores una secuencia solapante con el otro amplificador. En una segunda reacción de PCR, usando los cebadores externos (P1 y P4) y los amplificadores anteriores como molde, conseguimos fusionar ambos fragmentos en una única cadena de ADN. Los cebadores P1 y P4 contienen secuencias en sus extremos que no hibridan con el ADN molde y que contienen (i) secuencias de restricción para la digestión por enzimas previo a su ligación con un plásmido o (ii) secuencias que hibridan con los plásmidos conjugativos donde queremos integrar el fragmento mediante recombinación.

3.4.2. PCR concatenada

En el caso de necesitar añadir a un amplificado una secuencia conocida de la cual no tenemos molde, se pueden diseñar cebadores cuya secuencia incluya los nucleótidos que queremos añadir. Cuando dicha secuencia es muy larga, se puede ir introduciendo poco a poco en los oligonucleótidos mediante PCRs consecutivas, tal y como se esquematiza en la figura M4.

En nuestro caso, se utilizó esta estrategia para añadir los promotores Ptet, Ptet2 y Pro aguas arriba del *ytaA* o del gen *sfgfp*.

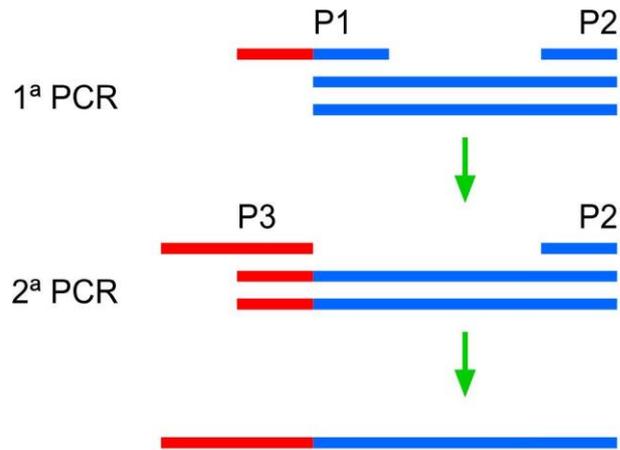


Figura M4. PCR concatenada. El fragmento azul representa el molde de ADN desde el que se inicia la reacción de PCR, los oligonucleótidos están nombrados como P1-P3 y la línea roja representa la secuencia de ADN que se añade gracias a los cebadores (en nuestro caso el promotor). Los oligonucleótidos de uno de los extremos (P1 y P3) van añadiendo la secuencia de interés de forma progresiva en sucesivas reacciones de PCR. El número de reacciones necesarias será proporcional al tamaño de la secuencia que queremos introducir.

3.5. Visualización del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

El ADN extraído o amplificado mediante PCR puede visualizarse mediante electroforesis en gel de agarosa.

La agarosa es un polímero que al solidificar forma una matriz porosa por la que podrán migrar las moléculas de ADN impulsadas por una corriente eléctrica continua. El ADN, de forma natural se encuentra cargado negativamente por lo que migrará hacia el polo positivo y durante su migración, se irá separando según su tamaño y conformación debido a la diferente velocidad de migración de cada molécula.

Los gels preparados en nuestro estudio contenían una concentración de agarosa del 1,4 % si el objetivo era visualizar productos de PCR o una concentración de 0,8 % en el caso de querer visualizar ADN genómico o plasmídico total. Añadimos a la agarosa, antes de que solidifique, 1 μ L de GelRed (gelred nucleic acid gel stain 10000x), un compuesto capaz de unirse al ADN y emitir fluorescencia en luz visible cuando es excitado con luz ultravioleta.

La agarosa se deja solidificar unos 20 min aproximadamente, hasta que adquiere consistencia de gel y se carga cada pocillo con una mezcla del ADN que queremos visualizar y tampón de carga (que contiene glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol, un colorante que nos permitirá saber la localización aproximada del ADN en migración) en una proporción 4:1 (v/v). Además, corrimos siempre un marcador de pesos moleculares que nos permitía inferir el tamaño del fragmento de ADN cuando éste era iluminado con luz ultravioleta.

Una vez el gel fue preparado y cargado con las muestras, se aplicó una corriente eléctrica continua de 120 V durante 30 min aproximadamente y se visualizó el resultado bajo una cámara de luz ultravioleta.

3.6. Digestión y ligación

Para poder introducir un fragmento de ADN en un plásmido, una de las estrategias más sencillas es recurrir a la digestión de ambos con enzimas de restricción que generen extremos compatibles para poder después unirlos mediante el proceso de ligación.

Los enzimas de restricción reconocen secuencias específicas de ADN, llamadas sitios de restricción, y cortan las dos cadenas de ADN a través de la ruptura de dos enlaces fosfodiéster en ese punto concreto o en un sitio no muy lejano a este. La eficiencia de los enzimas de restricción, al igual que ocurre con el resto de enzimas, depende de las condiciones ambientales (i.e. concentración de iones en la disolución, temperatura de la reacción, etc.).

Las reacciones de digestión se prepararon en un volumen final de 25 μ l añadiendo 0,25 μ l de cada enzima (entre 2,5 U y 5 U dependiendo de la enzima), 2,5 μ l del tampón 10x correspondiente, entre 150 ng y 400 ng de ADN y agua ultrapura autoclavada. En nuestro estudio, todas las reacciones de digestión se realizaron siguiendo el protocolo de tiempo, tampón y temperatura recomendado por la casa comercial NEB (New England Biolabs).

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

Los fragmentos digeridos con las enzimas que nos interesaban fueron posteriormente purificados mediante perlas magnéticas (ver apartado 3.7.). Posteriormente se midió su concentración mediante cuantificación fluorométrica utilizando Qubit dsADN HS Assay Kit y procedimos a su unión con el plásmido mediante una reacción de ligación.

La reacción de ligación corre a cargo del enzima T4 ligasa, que forma enlaces fosfodiéster entre el extremo 5' de una de las cadena nucleotídicas y el extremo 3' de la otra cadena. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 20 μ l en los que se añade 1 μ l del enzima T4 de NEB, 2 μ l del tampón 10x correspondiente para la ligación, la cantidad correspondiente de plásmido (~ 50 ng) e inserto (teniendo en cuenta la proporción 3 moléculas de inserto por cada molécula de plásmido) y agua autoclavada ultrapura hasta completar los 20 μ l. La reacción se dejó incubar a 16 °C *o.n.* y habitualmente se utilizaron 10 μ l de esta ligación para las transformaciones.

3.7. Purificación del ADN mediante perlas magnéticas

Para purificar el ADN tras procesos como digestión, PCR, y poder así eliminar restos de enzimas, sales o fragmentos nucleotídicos pequeños y de tamaño diferente al que nos interesa, utilizamos el kit Nucleo Mag[®] NGS Clean-up and size select (Macherey-Nagel), un kit habitualmente utilizado en el proceso de construcción de librerías para secuenciación masiva que purifica el ADN mediante la utilización de unas perlas magnéticas. En resumen, el ADN se une a las perlas magnéticas tras ser mezclados en proporción 1:1 (v/v) y se utiliza un sistema de separación magnético específico tras el cual podemos eliminar el sobrenadante y lavar el ADN con etanol. Posteriormente, se elimina el etanol y se dejaron secar durante 10 min para evitar que queden restos de alcohol que pudieran inhibir las reacciones posteriores. Finalmente, se eluye el ADN en agua autoclavada ultrapura.

3.8. Protocolo de transformación de células *E. coli*

Existen diferentes metodologías para introducir material exógeno en el interior celular. Nosotros utilizamos la transformación mediante choque térmico cuando el ADN que queríamos introducir era circular (i.e. plásmido) mientras que recurrimos a la electroporación para introducir un fragmento de ADN lineal (i.e. amplicón de PCR) ya que la introducción de ADN lineal resulta menos eficiente y requiere por tanto de un protocolo de transformación más eficiente (i.e. electroporación).

3.8.1. Transformación de células mediante choque térmico

El protocolo utilizado para la transformación mediante choque térmico fue descrito en 1989 por Sambrook y colaboradores (139). Para que las bacterias tengan capacidad de incorporar el plásmido debemos primero hacerlas competentes resuspendiéndolas en CaCl_2 0,1 M, que ayuda a permeabilizar la pared. La metodología fue la siguiente: a partir de un cultivo crecido *o.n* en LB líquido se hizo una dilución en medio fresco de manera que la absorbancia final, medida a una $\lambda = 600$ nm (A_{600}), fuera de 0,05. Posteriormente, se incubó el cultivo a 37 °C en agitación durante 2 horas para alcanzar la fase exponencial temprana ($A_{600} = 0,3-0,4$). En ese momento se detuvo el crecimiento celular incubando el cultivo en hielo durante 10 min. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 3000 rpm durante 5 min a una temperatura de 4 °C. A continuación se resuspendieron las células en 5 ml de CaCl_2 0,1 M estéril frío y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones. Finalmente se resuspendieron en 2 ml de CaCl_2 estéril frío y se alicuotó en alícuotas de 200 μL que fueron utilizadas de inmediato para la transformación.

En la transformación se añadieron 100 ng de plásmido por cada 200 μl de bacterias competentes y se provocó un choque térmico (30 min a 4 °C, 90 seg a 42 °C y de nuevo 4 °C) que permeabiliza la membrana y permite la introducción del ADN al interior de las células. Para terminar se resuspendieron las bacterias en 1 ml de LB y se incubaron en agitación a 37 °C durante 30 min para permitir su recuperación tras el

choque térmico antes de proceder al cultivo de diluciones en medio LB agar con los antibióticos apropiados para detectar transformantes.

De forma regular se añaden al proceso células competentes sin ADN plasmídico como control de la transformación y, en caso de querer transformar un plásmido al que hemos introducido alguna modificación, una alícuota de células competentes junto con el plásmido sin modificar, como control positivo de la transformación.

Es importante tener en cuenta que en el caso de las transformaciones del plásmido pKD46-Gm, que es termosensible, las incubaciones tras el choque térmico fueron realizadas a 28 °C.

3.8.2. Transformación de células mediante electroporación

Nuestro objetivo era transformar una cepa derivada de *E. coli* DH5 α que contenía tanto el plásmido conjugativo como el plásmido pKD46-Gm, que codifica para la recombinasa Red del fago λ . El fragmento de ADN que queríamos introducir consistía en las construcciones que hemos amplificado y purificado, con el fin de integrarlas en el plásmido conjugativo.

La electroporación permite la captación de ADN mediante la permeabilización de las membranas provocada por una descarga eléctrica. Con este método la eficacia de la transformación aumenta considerablemente, obteniendo entre 10^9 - 10^{10} transformantes por μ g de ADN (140). Utilizamos la electroporación en lugar del método de choque térmico descrito anteriormente ya que la eficiencia de transformación de ADN lineal es mucho menor que la de un plásmido.

A partir de un inóculo de la cepa de interés crecido toda la noche a 28 °C se realizó una dilución 1:100 en medio LB y se incubó a 28 °C en agitación a 250 rpm hasta que alcanzara una $A_{600} = 0,2$. Una vez alcanzada dicha absorbancia, se añadió arabinosa a una concentración final de 0,08 % para inducir la expresión de la recombinasa y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una $A_{600} = 0,6$. Después de enfriar el cultivo en hielo, se realizaron varias centrifugaciones sucesivas

de 10 min a 4200 rpm y 4 °C, en las que se fue disminuyendo el volumen al resuspender en 1, 0,5, 0,25 y finalmente 0,001 volúmenes de glicerol 10 % frío. De esta forma se concentran las bacterias y se disminuye la fuerza iónica de la suspensión celular al lavar las sales. Las células se mantuvieron en hielo hasta el momento de la electroporación en la que se mezclaron 50 µl de células con 1 µg del ADN que queremos incorporar en las bacterias. La electroporación se realizó en cubetas de 1 mm de grosor mediante un pulso eléctrico de 1800 V. Inmediatamente después de la electroporación se añadió 1 ml de medio S.O.C. (Super Optimal Broth with Glucose), específico para la recuperación celular tras las transformaciones y se incubaron las células 2 h en agitación a 28 °C para permitir la recombinación del cassette con el plásmido conjugativo. El medio S.O.C. se compone de: Extracto de levadura (5 %), triptona (2 %), NaCl (10 mM/l), KCl (2,5 mM/l), MgCl₂ (10 mM/l), MgSO₄ (10 mM/l) y glucosa añadida tras autoclavar el resto de los ingredientes (20 mM). Finalmente seleccionamos las células transformadas sembrando diluciones en medio LB agar suplementado con los antibióticos correspondientes.

3.9. Metodología empleada en la elaboración de las construcciones necesarias para el estudio de diseminación de EGM en la microbiota intestinal

3.9.1. Construcciones elaboradas utilizando como marcador fluorescente el gen *ytvA*

Con el objetivo de estudiar la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal, diseñamos una estrategia en la cual podemos seguir el rastro de un plásmido conjugativo gracias a la fluorescencia emitida por una proteína codificada por un gen que introducimos en el mismo. La expresión de este gen es regulada por un promotor de amplio espectro para permitir su expresión en el mayor número posible de bacterias de distinta taxonomía. Además, la bacteria donadora contiene en su genoma un represor para dicho promotor que impide que estas bacterias emitan fluorescencia. De este modo, únicamente veremos señal fluorescente en aquellas bacterias que adquieran el plásmido por conjugación (transconjugantes, TC) y no en la bacteria donadora del plásmido (Figura M5).

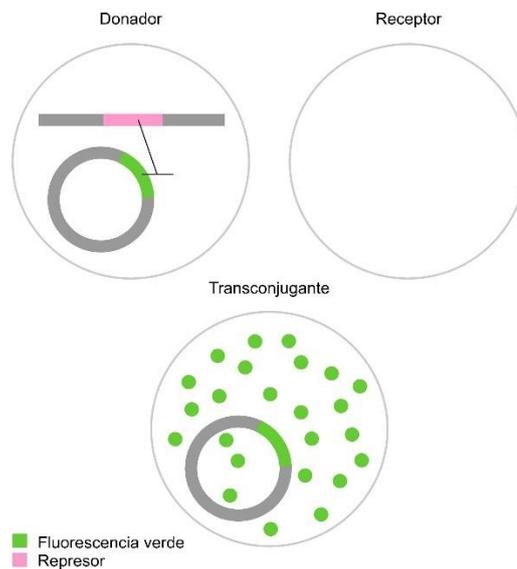


Figura M5. Representación esquemática de la fluorescencia que podremos detectar en los diferentes tipos de bacterias que analizamos. La bacteria donadora contiene el plásmido conjugativo con el gen de fluorescencia (verde), pero al mismo tiempo contiene en su genoma el represor del promotor de dicho gen (rosa) que impide la transcripción de éste, lo que evitará que estas bacterias sean detectadas como fluorescentes por citometría. La población aceptora no contiene el gen de fluorescencia por lo que no la detectaremos como fluorescente por el citómetro. Por último, las bacterias TC, que adquieren el plásmido con el gen de fluorescencia pero carecen de represor en su genoma, serán las únicas detectadas como fluorescentes por el citómetro.

Para conseguir la construcción plasmídica que exprese proteínas fluorescentes en condiciones anaeróbicas regulada por un promotor constitutivo de amplio espectro se realizaron diversas clonaciones inicialmente en un plásmido lanzadera que finalmente serían integradas en plásmidos conjugativos para detectar por citometría de flujo su fluorescencia.

Todas las construcciones intermedias que se describen en el apartado de metodología hasta llegar a las construcciones finales fueron comprobadas mediante diversas técnicas para asegurar la correcta clonación de cada uno de los elementos de las mismas: (i) crecimiento en placas de agar con el antibiótico correspondiente, (ii) digestión del plásmido que las contiene y visualización en gel de agarosa, (iii) PCR con oligonucleótidos específicos para comprobar el tamaño de la banda en electroforesis y (iv) secuenciación por Sanger.

Inicialmente se utilizó el gen *ytvA* que codifica para la proteína FbFP, de la que está descrita su fluorescencia tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (7).

Dicho gen se clonó bajo la acción del promotor sintético PA1/04/03 (nos referiremos a él en el texto como Plac) modificado para poder aumentar la expresión del gen al que precede, y acompañado de un gen de resistencia a antibiótico (Figura M6). La construcción se encuentra flanqueada (F) por 60 nt que permiten su recombinación en el interior del plásmido conjugativo R388.

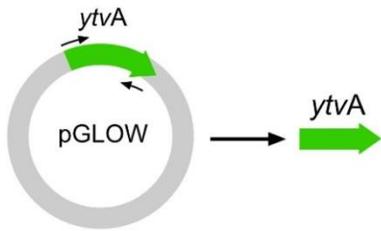


Figura M6. Esquema de la construcción realizada para el estudio de diseminación de EGM en la microbiota intestinal. Las flechas indican los genes que componen la construcción, bien de fluorescencia (*ytvA*) o marcadores de resistencia a antibiótico (AB), en este caso kan. El rectángulo amarillo indica la posición del promotor clonado que regula la expresión del gen fluorescente, en este caso el promotor usado fue PA1/04/03 (Plac). Los rectángulos naranjas representan los 60 nt homólogos al punto donde queremos insertar la construcción dentro del plásmido conjugativo R388.

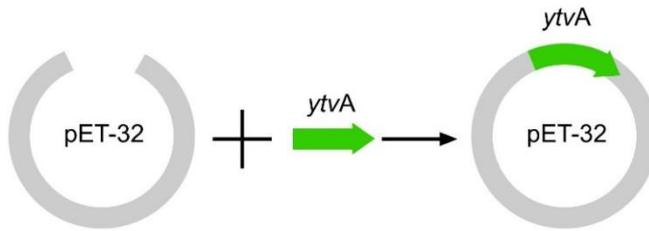
En la figura M7 podemos observar, a modo de resumen, un pequeño esquema de los pasos seguidos hasta llegar a introducir la construcción final en el interior del plásmido conjugativo.

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

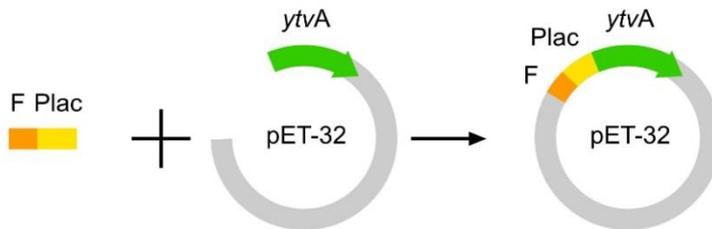
A Amplificación del gen *ytvA*.



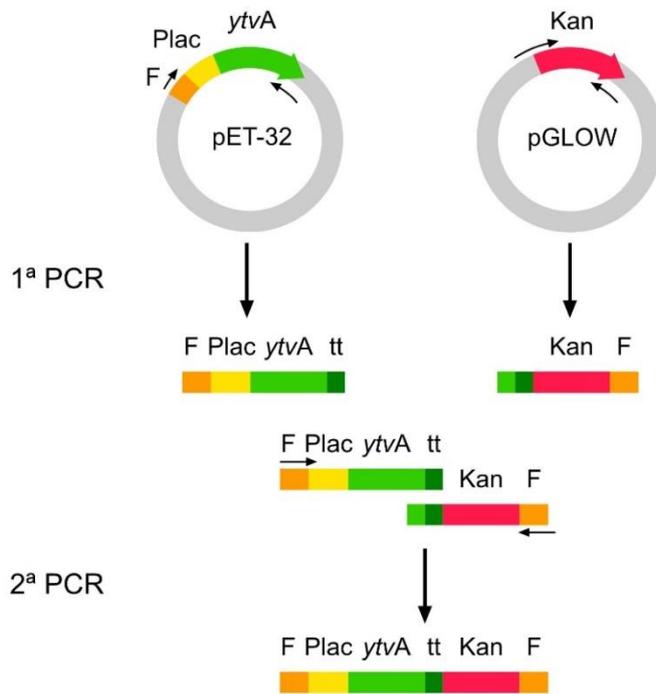
B Inserción del gen de fluorescencia en plásmido lanzadera.



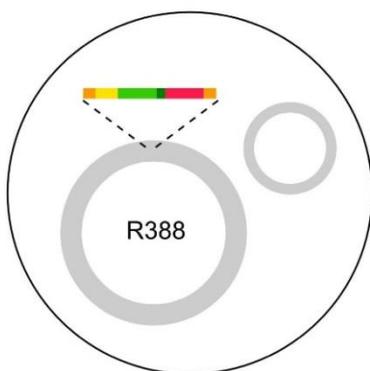
C Amplificación e inserción del promotor y la secuencia flanqueante izquierda en el plásmido lanzadera.



D Amplificación y fusión del terminador de *ytvA*, gen de resistencia a antibiótico y secuencia flanqueante derecha.



E Recombinación en plásmido conjugativo.



F Resultado final del proceso.

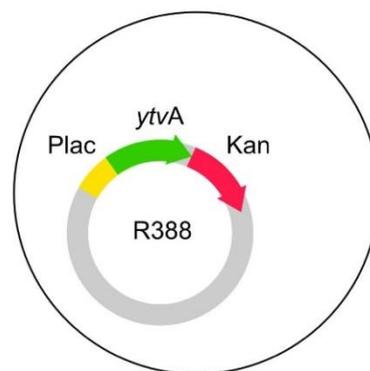


Figura M7. Esquema del proceso de construcción del cassette de fluorescencia. (A) Amplificación del gen *ytvA* utilizando como molde el plásmido pGLOW. **(B)** Ligación del plásmido lanzadera pET-32 y el gen *ytvA* digeridos previamente con los mismos enzimas de restricción. **(C)** Ligación del plásmido lanzadera pET-32::*ytvA* con el producto amplificado por PCR que contiene el promotor Plac y la secuencia flanqueante izquierda, ambos previamente digeridos con los mismos enzimas de restricción. **(D)** Fusión del gen *ytvA*, su promotor y la secuencia flanqueante izquierda con el gen de resistencia a antibiótico y la secuencia flanqueante derecha. **(E)** Recombinación del cassette de fluorescencia en el interior del plásmido conjugativo R388. El cassette contiene las secuencias flanqueantes que son homólogas al punto donde se desea introducir la construcción, por lo que con ayuda del enzima recombinasa Red del fago λ , codificada por un plásmido accesorio, puede llevarse a cabo la recombinación homóloga y la introducción del cassette en el plásmido conjugativo. **(F)** Resultado final de la introducción del cassette de fluorescencia en el interior del plásmido conjugativo tras eliminar el plásmido accesorio que codifica para la recombinasa.

En primer lugar, se amplificó mediante PCR (ver apartado 3.4.) la secuencia del gen *ytvA* a partir del plásmido comercial pGLOW usando los cebadores EcFbFP-F7-Nc y EcFbFP-R8-H (ver tabla M4) que añaden sitios de restricción *NcoI* y *HindIII* en los extremos del gen (Figura M7A).

El fragmento resultante fue digerido (ver apartado 3.6.) con dichos enzimas y ligado (ver apartado 3.6.) con el plásmido lanzadera pET-32, que contiene resistencia a amp, previamente digerido con los mismos enzimas (Figura M7B). El producto de la ligación fue utilizado para la transformación por choque térmico de *E. coli* DH5 α generando la cepa DH5 α /pET-32::*ytvA*.

Una vez insertado el gen *ytvA* en el plásmido lanzadera, se procede a la amplificación del promotor Plac y del fragmento flanqueante izquierdo. Las secuencias flanqueantes se componen de 60 nt homólogos al punto donde deseamos que se introduzca el fragmento en el interior del plásmido conjugativo. Al tener homología, y gracias a la ayuda de una recombinasa, el fragmento podrá quedar introducido mediante recombinación en el interior del plásmido de interés. Esta técnica de recombinación por homología basada en la recombinasa Red del fago λ fue descrita por Datsenko y Wanner en 2000 (141) y permite la introducción o sustitución de pequeños fragmentos de ADN en el interior de genomas o plásmidos bacterianos.

Para ello se realizó una PCR (ver apartado 3.4.) de la región flanqueante izquierda a recombinar con el plásmido conjugativo usando los cebadores R388-F1-Bg

y R388-R2-Xb (ver tabla M4) que añaden los sitios de restricción *Bgl*II y *Xba*I en los extremos del amplificado; además, el oligo R388-R2-Xb introduce la secuencia del promotor Plac. El molde utilizado para esta PCR fue el plásmido R388, el plásmido en el cual se desea finalmente introducir la construcción. Una vez obtenido el amplificado, se digiere con los enzimas *Bgl*II y *Xba*I y se procede a su ligación (ver apartado 3.6.) con el plásmido pET-32::y*tvA*, previamente digerido con los mismos enzimas (Figura M7C). El plásmido resultante fue clonado en *E. coli* generando la cepa CU129 (ver tabla M5) *E. coli* DH5 α /pET-32::Plac::y*tvA* cuya fluorescencia fue comprobada por citometría de flujo (ver apartado 3.14.).

Tras testar la fluorescencia de la cepa, se procedió a añadir a la construcción (i) un terminador para el gen y*tvA*, (ii) el gen marcador de resistencia a antibiótico (kan), y (iii) la secuencia flanqueante derecha mediante una PCR fusión (ver apartado 3.4.1). La PCR fusión consiste en la realización de varias PCRs con una región solapante entre ellas de modo que, en el último paso, utilizando los cebadores más externos podamos obtener una única secuencia que unifique todos los fragmentos de interés.

En nuestro caso realizamos por un lado dos PCRs independientes. En una de ellas (1ª PCR) utilizamos como molde el vector pET-32::Plac::y*tvA* conteniendo el promotor y gen de la proteína fluorescente. Los cebadores utilizados fueron pET28-1-F y R388-F2-E (ver tabla M4) que añaden un terminador aguas abajo del gen y*tvA* y un sitio de corte *Eco*RI.

Para la 2ª PCR el molde utilizado fue el plásmido pET-28a, para amplificar el gen de resistencia a kanamicina con los cebadores KanR-1-F y KanR-2-R-B (ver tabla M4) que añaden también la secuencia flanqueante derecha de recombinación con el plásmido conjugativo y 20 nucleótidos que solapan con la 1ªPCR (Figura M7D).

La 1ª y 2ª PCR son parcialmente solapantes, por ello, al usarlas como molde junto con unos oligonucleótidos externos a la construcción (3ª PCR), en nuestro caso R388-F3 y R388-R4 (ver tabla M4), podemos obtener un único fragmento que engloba la totalidad de la secuencia (Figura M7D). Además, al usar estos oligonucleótidos estamos eliminando los sitios de restricción de los extremos de la construcción de modo que podremos proceder directamente a su transformación por electroporación

(ver apartado 3.8.2.) en la cepa CU200 (ver tabla M5) *E. coli* DH5 α /pKD46-Gm /R388, que contiene tanto el plásmido conjugativo R388, como el plásmido pKD46-Gm, un plásmido termosensible que codifica para la recombinasa Red del fago λ bajo un promotor inducible por arabinosa (130) y que permite la recombinación del fragmento transformado en el plásmido conjugativo por recombinación homóloga.

Tras realizar la electroporación, se indujo la expresión de la recombinasa que permitió la introducción por recombinación homóloga del fragmento de PCR en el plásmido conjugativo (Figura M7E). Una vez realizada la recombinación, para eliminar el plásmido que codifica la recombinasa, se movilizó el plásmido conjugativo R388::Plac::ytvA::kan mediante conjugación (ver apartado 3.10.) a la cepa aceptora CU9 (ver tabla M5) *E. coli* DH5 α ::cat, cepa derivada de la cepa *E. coli* DH5 α que contiene un marcador cromosómico (cat) que le confiere resistencia a cloranfenicol. De esta manera se obtuvo la cepa CU188 (ver tabla M5) *E. coli* DH5 α ::cat / R388::Plac::ytvA::kan. Posteriormente se procedió a testar la fluorescencia por citometría de flujo (ver apartado 3.14.). Además, también se testó que tan solo el plásmido conjugativo se había transferido y que, por tanto, se había perdido el plásmido que codificaba para la recombinasa. Para ello se comprobó que la cepa CU188 no era capaz de crecer cuando la cultivábamos en medio LB con gentamicina, el antibiótico al que confiere resistencia el plásmido pKD46-Gm que codifica para la recombinasa.

Al visualizar la cepa con la construcción R388::Plac::ytvA mediante citometría de flujo, se detectó la pérdida de la señal fluorescente en anaerobiosis (Resultados, FiguraFigura R3), por lo que se decidió obtener nuevas construcciones con el fin de testar diferentes promotores que pudiesen incrementar la señal de fluorescencia en condiciones de anaerobiosis. Para ello seleccionamos promotores que tuvieran un amplio espectro (i.e. se expresaran en múltiples especies bacterianas filogenéticamente distantes), y de los que se disponga de un represor capaz de inhibir su expresión en la célula donadora, de manera que la fluorescencia solo se detectara en la célula transconjugante (TC). Los promotores seleccionados fueron el promotor del gen de tetraciclina (Ptet), un promotor derivado de Ptet (Ptet2) que incrementa la expresión del gen asociado, al menos en *E. coli* (142) y el promotor Pro del fago P1.

Además, se decidió introducir las construcciones obtenidas en el plásmido RP4, además de en el plásmido R388, para poder estudiar transferencia de dos plásmidos conjugativos distintos.

El plásmido conjugativo RP4 confiere resistencia a kanamicina, por lo que se cambió el diseño de la construcción para introducir un gen que codifica para una acetiltransferasa que confiere resistencia a cloranfenicol (*cat*) en lugar de un gen que confiera resistencia a kanamicina. El esquema de la nueva construcción se puede observar en la figura M8.

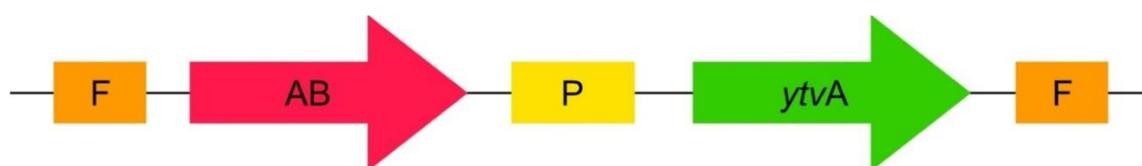


Figura M8. Esquema de la construcción realizada para el estudio de diseminación de EGM en la microbiota intestinal. Las flechas indican los genes que componen la construcción: gen que expresa fluorescencia (*ytvA*) o marcadores de resistencia a antibiótico (AB), en este caso confieren resistencia a *cm* (*cat*). El rectángulo amarillo indica la posición del promotor clonado para controlar la expresión del gen que expresa la proteína fluorescente y los rectángulos naranjas representan los 60 nt homólogos al punto donde queremos insertar la construcción dentro del plásmido conjugativo (R388 o RP4). En este caso los promotores usados fueron: Ptet, Ptet2 y Pro.

Estas construcciones con los nuevos promotores siguieron un proceso diferente en cuanto a su construcción que se esquematiza en la figura M9. Cabe destacar que para estas construcciones se utilizó un plásmido lanzadera distinto debido a que el sitio de clonación múltiple que contenía este plásmido era más apropiado para obtener las construcciones diseñadas (i.e. organización de enzimas de restricción en el sitio de clonaje múltiple).

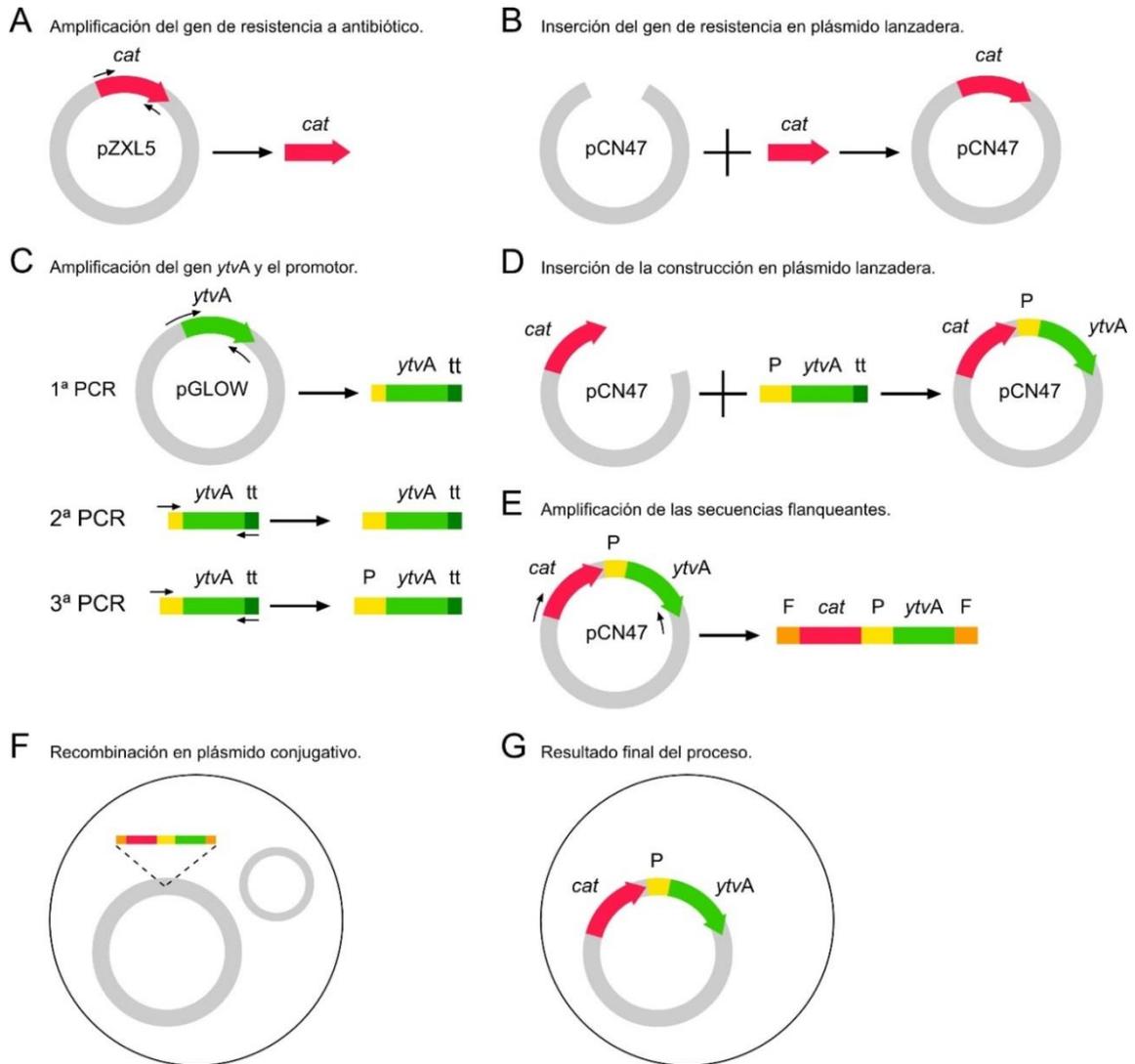


Figura M9. Esquema del proceso de construcción del cassette de fluorescencia. (A) Amplificación del gen de resistencia a antibiótico (*cat*) utilizando como molde el plásmido pZXL5. **(B)** Ligación del plásmido lanzadera pCN47 y el gen de resistencia al antibiótico previamente digeridos con los mismos enzimas de restricción. **(C)** Amplificación del gen de fluorescencia y su promotor. El gen *ytvA* se amplifica utilizando como molde el plásmido pGLOW. Los cebadores utilizados para su amplificación añaden por un lado un terminador para impedir la expresión de la secuencia adyacente al gen y por el otro, parte de la secuencia del promotor. Para acabar de amplificar el promotor, se hacen varias PCRs consecutivas en las que el cebador directo va añadiendo de forma progresiva la secuencia del promotor. El número de PCRs necesarias para tener el promotor completo dependerá de la longitud del promotor. **(D)** Ligación del plásmido lanzadera pCN47::*cat* con el producto amplificado por PCR que contiene el promotor y el gen que codifica para la proteína fluorescente. Ambos elementos a ligar han sido digeridos con los mismos enzimas de restricción. **(E)** Amplificación de la construcción a partir del plásmido lanzadera utilizando cebadores que añaden las secuencias flanqueantes de los dos extremos. **(F)** Recombinación del cassette de fluorescencia con el plásmido conjugativo R388 o RP4. El cassette contiene las secuencias flanqueantes que son homólogas al punto donde se desea introducir la construcción, por lo que con ayuda del enzima recombinasa Red del fago λ , codificada por el plásmido accesorio, puede llevarse a cabo la recombinación

homóloga y la introducción en el plásmido conjugativo. **(G)** Resultado final de la introducción del cassette de fluorescencia completo en el interior del plásmido conjugativo tras movilizar el plásmido conjugativo (pero no el plásmido accesorio que codifica para la recombinasa) a una nueva cepa.

Por un lado, se amplificó mediante PCR (ver apartado 3.4.) el gen *cat*, que confiere resistencia a cloranfenicol, usando como molde el plásmido pZXL5 (nº acceso GenBank: JQ088279.1) y los oligonucleótidos OCU108 y OCU109 (ver tabla M4) que añaden los sitios de restricción *Bam*HI y *Kpn*I (Figura M9A). Tanto el amplificado como el plásmido lanzadera pCN47 se digirieron (ver apartado 3.6.) con los enzimas *Bam*HI y *Kpn*I, se ligaron (ver apartado 3.6.) (Figura M9B) y se procedió a la transformación de *E. coli* obteniéndose la cepa CU554 (ver tabla 2.5) *E. coli* DH5α / pCN47::*cat*.

Por otro lado, se construyeron mediante PCRs concatenadas (ver apartado 3.4.2.) los cassettes que contienen: (i) promotor, (ii) gen *ytaA* que codifica para la proteína fluorescente FbFP y (iii) un terminador para impedir la expresión de la región adyacente al gen (Figura M9C). En este tipo de PCR, los cebadores utilizados van introduciendo la secuencia de interés, en nuestro caso la del promotor correspondiente, de forma secuencial. Serán necesarias 2 o 3 reacciones consecutivas según la longitud del promotor a utilizar. Para los promotores Ptet2 y Pro se tuvieron que realizar 3 reacciones de PCR concatenadas, mientras que fueron suficientes 2 reacciones para la introducción del promotor Ptet, como puede observarse en la tabla M2.

El molde para la 1ª PCR será el plásmido pGLOW que contiene gen *ytaA* y el oligo reverso será para todos los casos OCU-110 (ver tabla M4) que añade el terminador para el gen *ytaA* y el sitio de restricción *Eco*RI.

En la tabla M2 se pueden encontrar los distintos cebadores directos utilizados según el tipo de promotor que se quiera clonar en cada una de las construcciones:

Tabla M2. Molde y oligonucleótidos directos utilizados para la introducción de la secuencia del promotor que controlará la expresión del gen que codifica para la proteína fluorescente. La secuencia de los cebadores se puede encontrar en la tabla M4.

	Ptet	Ptet2	Pro	Molde
1ª PCR	OCU-112	OCU-117	OCU-114	pGLOW
2ª PCR	OCU-113	OCU-118	OCU-115	1ªPCR
3ª PCR		OCU-119	OCU-116	2ªPCR

Tras sucesivos problemas para la obtención del promotor Ptet2, se decidió realizar, para esta clonación en concreto, una 4ª PCR con los oligonucleótidos OCU-145 y OCU-146 que añaden algunos nucleótidos extra al lado de las secuencias de restricción para mejorar la eficiencia de la digestión.

Todos los amplificadores finales, al igual que el vector pCN47::cat, se digirieron (ver apartado 3.6.) utilizando los enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRI* y se procedió a la ligación de ambos (Figura M9D) y a la transformación mediante choque térmico (ver apartado 3.8.1.) de *E. coli* generándose las cepas CU555, CU564 y CU556 (ver tabla M5) que se corresponden con cepas de *E. coli* DH5α conteniendo respectivamente las siguientes construcciones pCN47::cat::Ptet::ytvA, pCN47::cat::Ptet2::ytvA y pCN47::cat::Pro::ytvA que fueron testadas por citometría de flujo (ver apartado 3.14.).

Una vez obtenidas las construcciones en el plásmido lanzadera, se amplificaron (ver apartado 3.4.) con cebadores que añaden las secuencias flanqueantes (Figura M9E) para introducir la construcciones con los promotores Ptet y Ptet2 (por ser los que mayor fluorescencia expresaban) en el plásmido conjugativo correspondiente, bien en R388 (usando los oligonucleótidos OCU-139 y OCU-140), bien en RP4 (con los oligonucleótidos OCU-141 y OCU-142). A continuación, con los amplificadores obtenidos, se transformaron mediante electroporación (ver apartado 3.8.2) las cepas de *E. coli* CU200 y CU552 (ver tabla M5) que contienen tanto el plásmido conjugativo como el plásmido accesorio que codifica para la recombinasa (Figura M9F). Posteriormente se transfirió el plásmido conjugativo obtenido (ver apartado 3.10.) a una cepa de *E. coli* DH5α resistente a stp (Figura M9G) y se cuantificaron los niveles de fluorescencia de

las cepas resultantes (CU567, CU569, CU568 y CU570) mediante citometría de flujo tal y como se describe en el apartado 3.14. En los resultados obtenidos con estas nuevas construcciones, se mantuvo el problema de la pérdida de señal fluorescente en anaerobiosis (Resultados, Figura R5B), por lo que se diseñó una nueva estrategia con el gen *sfgfp*, tal y como se describe a continuación.

3.9.2. Construcciones elaboradas utilizando como marcador fluorescente el gen *sfgfp*

A pesar de testar distintos promotores, las construcciones de los plásmidos conjugativos con el gen *ytaA* en condiciones de anaerobiosis no producían una fluorescencia suficiente para poder diferenciar las bacterias que contenían los plásmidos con las construcciones con el gen *ytaA*, de las partículas autofluorescentes de las heces (Resultados, Figura R5B). Por este motivo, y tras la reciente publicación de una proteína GFP modificada (superfolder GFP, *sfgfp*) que había sido utilizada con éxito para detectar bacterias anaeróbicas mediante fluorescencia (12) se decidió cambiar el gen *ytaA* por el *sfgfp* manteniendo la estructura de la construcción (Figura M10).

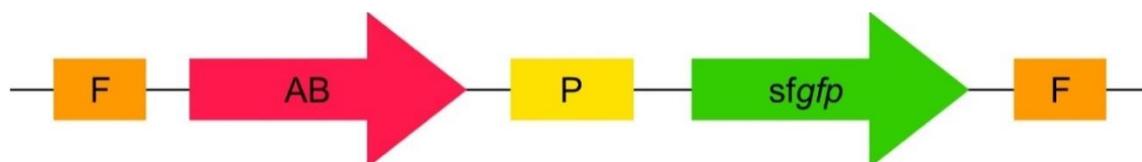


Figura M10. Esquema de la construcción realizada para el estudio de diseminación de EGM en la microbiota intestinal. Las flechas indican los genes que componen la construcción, bien de fluorescencia (*sfgfp*) o marcadores de resistencia a antibiótico (AB), en este caso cm. El rectángulo amarillo indica la posición del promotor clonado para el gen que codifica la proteína fluorescente y los rectángulos naranjas representan los 60 nt homólogos al punto donde queremos insertar la construcción dentro del plásmido conjugativo (R388 o RP4). En este caso los promotores usados fueron: Ptet, Ptet2 y Plac.

Se repitieron las PCRs concatenadas (ver apartado 3.4.2) para amplificar el gen *sfgfp* e ir añadiendo en reacciones sucesivas, mediante distintos cebadores, el promotor correspondiente. Mediante esta estrategia se clonaron únicamente los promotores Ptet y Ptet2 ya que los resultados de citometría mostraban que el promotor Pro era el que menor fluorescencia inducía y decidimos descartarlo.

En la tabla M3 se muestran los cebadores directos utilizados para las PCRs concatenadas. El molde utilizado para la 1ª PCR fue el plásmido comercial pET-*sfGFP* (Addgene) y el oligo reverso utilizado para todas las PCRs fue OCU-150 (ver tabla M4) que añade un terminador para el gen *sfGFP*.

Tabla M3. Molde y oligonucleótidos directos utilizados para la introducción de la secuencia del promotor en la construcción que expresa fluorescencia mediante el gen *sfGFP*. La secuencia concreta de los cebadores se puede encontrar en la tabla M4.

	Ptet	Ptet2	Molde
1ª PCR	OCU-148	OCU-149	pET- <i>sfGFP</i>
2ª PCR	OCU-113	OCU-118	1ªPCR
3ª PCR		OCU-119	2ªPCR

Al igual que ocurrió con la construcción Ptet2::*ytvA*, para este promotor se realizó una 4ª PCR con los oligonucleótidos OCU-145 y OCU-146 (ver tabla M4) que añaden algunos nucleótidos extra a los extremos de las secuencias de restricción para mejorar la eficiencia de la digestión.

Nuevamente los amplificadores y el vector pCN47::*cat* fueron digeridos (ver apartado 3.6.) con *KpnI* y *EcoRI*, y posteriormente ligados (ver apartado 3.6.). El producto de la ligación fue utilizado para transformar la cepa *E. coli* DH5α (ver tabla M5). De esta manera se obtuvieron las cepas CU575 y CU577 (ver tabla M5) que se corresponden con cepas *E. coli* DH5α conteniendo las construcciones pCN47::*cat*::Ptet::*sfGFP* y pCN47::*cat*::Ptet2::*sfGFP* respectivamente. La fluorescencia de las cepas se comprobó tal y como se describe en el apartado 3.14. de este trabajo y los resultados pueden observarse en la figura R8A del apartado “Resultados”.

Teniendo en cuenta que la fluorescencia de la proteína sfGFP es significativamente mayor que la generada por FbFP, se decidió recuperar el promotor Plac para testarlo junto al gen *sfGFP* en los dos plásmidos conjugativos esperando poder obtener suficiente fluorescencia con la proteína *sfGFP* como para poder visualizar aquellas bacterias receptoras del plásmido conjugativo. La estrategia utilizada

para clonar el promotor Plac fue algo diferente a la usada con el resto de los promotores. Por un lado, se amplificó (ver apartado 3.4.) el promotor Plac a partir de la cepa MG1655/ RP4::Plac::GFPm3 (ver tabla M5) cedida por el laboratorio del profesor Sorensen, utilizando los cebadores OCU270 y OCU271 (ver tabla M4) que añaden el sitio de restricción *KpnI* y una cola de 34 nt que hibride con el gen *sfgfp* para una posterior PCR fusión.

Por otro lado, se amplificó (ver apartado 3.4.) el gen *sfgfp* a partir del plásmido comercial pET- *sfgfp*, usando los oligonucleótidos OCU-272 y OCU-150 (ver tabla M4). Para fusionar ambos amplificados, se utilizó el Kit Gibson assembly (Addgene) con los 2 productos de PCR. Este kit permite la unión de varios fragmentos de ADN lineal con secuencias solapantes en un único fragmento de doble cadena y en un único paso (143). Posteriormente se amplificó (ver apartado 3.4.) el fragmento con los cebadores externos OCU-270 y OCU-150 (ver tabla M4) que unifican toda la construcción y se digirieron (ver apartado 3.6.) tanto el producto de PCR como el plásmido lanzadera pCN47::*cat* para ligarlos (ver apartado 3.6.) y seguidamente transformar una cepa de *E. Coli* DH5 α , como se había hecho con el resto de las construcciones. De esta manera se obtuvo la cepa CU750 (ver tabla M5) *E. coli* DH5 α / pCN47::*cat*::Plac::*sfgfp*. La fluorescencia de dicha cepa fue comprobada por citometría de flujo como se describe en el apartado 3.14.

Una vez comprobada la fluorescencia de las distintas cepas obtenidas, se amplificaron las distintas construcciones utilizando los cebadores que añaden las secuencias flanqueantes para introducir la construcción completa en el plásmido conjugativo correspondiente, bien en R388 (usando los oligonucleótidos OCU-139 y OCU-140), bien en RP4 (con los oligonucleótidos OCU-141 y OCU-142) y se transformaron por electroporación (ver apartado 3.8.2) las cepas de *E. coli* CU200 y CU552 (ver tabla M5) que contienen tanto el plásmido conjugativo como el plásmido accesorio que codifica para la recombinasa Red del fago λ . A continuación, se transfirió el plásmido conjugativo obtenido (ver apartado 3.10) a una cepa de *E. coli* DH5 α resistente a *stp* y se cuantificaron los niveles de fluorescencia de las cepas resultantes (CU581, CU582, CU572, CU579, CU580, CU571) mediante citometría de flujo tal y como se describe en el apartado 3.14.

El último paso para terminar la construcción de las bacterias donadoras fue transferir mediante conjugación los plásmidos comprobados a una cepa de *E. coli* DH5 α Z1 o DH5 α Z1 stp^R (CU719). Estas cepas contienen en su genoma represores tanto para el promotor Ptet (y Ptet2 que es un derivado de Ptet) como para el promotor Plac. De modo que la fluorescencia de las bacterias donadoras de plásmido estará reprimida y solo se detectarán por citometría de flujo aquellas células que hayan adquirido el plásmido conjugativo (Figura M3).

3.10. Experimentos de conjugación *in vitro*

Durante el proceso de construcción de la cepa donadora recurrimos a la conjugación en varias ocasiones, i.e. tras la recombinación homóloga de la construcción en el plásmido conjugativo, en lugar de curar el plásmido termosensible mediante aumento de temperatura, o para introducir el plásmido conjugativo con la construcción final en el interior de la cepa que contiene el represor cromosómico (DH5 α Z1).

En estos casos, tanto la bacteria donadora como la aceptora se crecieron *o.n.* en un matraz con medio LB líquido que contiene los antibióticos correspondientes para asegurarnos de que se mantiene el plásmido. Al día siguiente se mezclaron 250 μ L de cada uno de los cultivos y se centrifugaron a 6000 rpm durante 3 min. El pellet se resuspendió en el mínimo volumen posible (<10 μ l) de medio, el cual se pipeteó sobre una membrana de nitrato de celulosa de 0,2 μ m de poro y 25 mm de diámetro de Whatman. La membrana fue previamente colocada sobre una placa con medio LB agar sin antibiótico precalentada a 37 °C, lo que proporciona la superficie sólida requerida para la conjugación de estos plásmidos. El poro de la membrana permite el paso de los nutrientes, pero retiene a las bacterias, que al haber sido resuspendidas en un volumen mínimo quedan concentradas. El hecho de tener las bacterias concentradas facilita por un lado el contacto entre células donantes yceptoras y, por otro lado, su posterior lavado y recuperación. La membrana se incubó 1 h a 37 °C y posteriormente se resuspendieron las bacterias en 5 ml de tampón fosfato salino (PBS). Finalmente se

hicieron diluciones para cultivar en medio LB agar con los antibióticos necesarios para detectar TC.

Por otro lado, con el fin de comprobar la capacidad de diseminación de los plásmidos conjugativos generados entre dos cepas de *E. coli* y la capacidad de detección de los TC tanto por cultivo en medio selectivo como por citometría, se realizaron una serie de experimentos *in vitro*. Para ello, se crecieron durante 48 h en anaerobiosis tanto las cepas donadoras CU583 y CU585 (cepas de *E. coli* DH5 α Z1 con las construcciones R388::*cat*::Ptet::*sfgfp* y RP4::*cat*::Ptet::*sfgfp*), como la cepa aceptora CU193 *E. coli* DH5 α *stp*^R en medio LB agar con los antibióticos correspondientes para cada cepa. La incubación en anaerobiosis se realizó utilizando una cámara anaeróbica (Whitlet DG250) con una atmósfera de 10 % H₂, 10 % de CO₂ y 80 % N₂.

Una vez crecidas las bacterias, se recogieron los cultivos con una torunda de algodón y se resuspendieron las bacterias en PBS con cisteína (PBScys) previamente reducido. La cisteína es un agente reductor que ayuda a mantener el ambiente anaeróbico de la solución durante más tiempo. A continuación se procedió a contar el número de células de la suspensión mediante la cámara de Neubauer (ver apartado metodología 3.12.) y se mezclaron donante y aceptor en proporción 1:1 para tener una cantidad final de 10⁸ bacterias.

La suspensión bacteriana se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto y el pellet celular, resuspendido en el mínimo volumen de PBScys posible (<10 μ l), se transfirió a una membrana de nitrocelulosa colocada sobre una placa de LB agar sin antibiótico. Tras 24 h de incubación en la membrana, se resuspendieron las bacterias del filtro en 2 ml de PBScys. Posteriormente se crecieron diluciones de las bacterias resuspendidas en medio selectivo para detectar TC (LB agar conteniendo cm y *stp*), mientras que paralelamente se analizó por citometría de flujo el número de células fluorescentes (ver apartado 3.14.).

Como controles del experimento se utilizaron tanto la cepa donante como la aceptora de forma aislada, comprobando que no crecen TC en el medio selectivo cuando donante y aceptor se incuban de forma separada, y que no había fluorescencia

previa a la incubación conjunta de las cepas, confirmando así que todas las células fluorescentes observadas aparecen tras la conjugación.

3.11. Experimentos de conjugación *ex vivo*

Una vez conseguidas las construcciones y hecha la puesta a punto para la visualización de bacterias fluorescentes por citometría (ver apartado 3.14.) se realizaron diferentes experimentos *ex vivo* con el fin de detectar TC desde la bacteria donadora a bacterias de la microbiota intestinal de ratón o humana.

3.11.1. Microbiota intestinal de ratón como población aceptora de los plásmidos conjugativos

El contenido cecal de ratones recién sacrificados se resuspendió en 1 ml de PBScys. La muestra fue sometida a un proceso de doble centrifugación en el que, en un primer paso se eliminaron las partículas de mayor tamaño, como pueden ser los restos de alimentación, agregados, etc. centrifugando 2 min a 200 rpm. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 1 min con el fin de sedimentar la población bacteriana. El pellet bacteriano obtenido fue resuspendido en 2 ml de PBScys reducido, de los cuales 100 µl fueron utilizados para el conteo de células en la cámara de Neubauer (ver apartado 3.12.). El resto se mantuvo en el ambiente anaeróbico durante unos minutos hasta su uso.

Las bacterias donadoras (CU583, CU585, CU753 y CU754), cepas de *E. coli* DH5αZ1 conteniendo los plásmidos R388 o RP4 con las construcciones Ptet::*sfgfp* o Plac::*sfgfp*, previamente crecidas durante 48 h en anaerobiosis utilizando el medio de cultivo LB agar con el antibiótico correspondiente, fueron recogidas con la ayuda de una torunda de algodón y fueron resuspendidas en 2 ml de PBScys. Al igual que ocurre con las célulasceptoras, 100 µl se utilizaron para contar el número de células utilizando la cámara de Neubauer. El resto de bacterias se mantuvieron en anaerobiosis hasta su uso después del conteo.

Una vez calculadas las concentraciones de células por ml en la cámara de Neubauer, se mezclaron en un mismo tubo el volumen necesario de bacteria donadora y microbiota aceptora para obtener un total de 10^8 células en proporción 1:1 (donadora:aceptora). Posteriormente se centrifugó la mezcla a máxima velocidad durante 1 min y el pellet bacteriano se resuspendió en el mínimo volumen posible y se transfirió a una membrana de nitrato de celulosa de 0,2 μm de poro y 25 mm de diámetro. La mezcla se incubó durante 24 h en condiciones anaeróbicas. El filtro de celulosa se colocó durante este periodo de incubación en una placa de CBA de forma que las bacterias pueden disponer de los nutrientes que requieren por difusión a través del filtro, estando al mismo tiempo concentradas en la menor superficie posible de forma que se maximiza el contacto entre ellas y la posible diseminación del plásmido. Cabe destacar que en una tesis anterior de nuestro grupo (144), demostramos que el medio CBA es capaz de permitir el crecimiento de una gran diversidad de especies bacterianas comensales intestinales.

Para asegurarnos de que las bacterias aceptoras eran viables, se realizó el mismo experimento utilizando como células aceptoras las bacterias del ciego de ratón cultivadas durante 6 días en anaerobiosis en el medio de cultivo CBA. Las condiciones del cultivo se basaron en estudios previos de nuestro grupo de investigación en los que se observaron las condiciones idóneas para poder crecer la mayor diversidad de bacterias posibles de la microbiota intestinal (144). Tras los 6 días de crecimiento en anaerobiosis, se cuantificaron las células con la cámara de Neubauer y se procedió a la incubación junto con las células donadoras siguiendo las condiciones indicadas previamente.

Tras las 24 h de incubación en anaerobiosis de las células donadoras junto con las células aceptoras, la bacterias de la membrana de nitrocelulosa se resuspendieron en 2 ml de PBScys, y se inició la exposición a oxígeno que permitió que la proteína fluorescente se plegara correctamente (3h a 4 °C). A continuación, la muestra se separó en 2 alícuotas: una parte de la muestra para analizarse por citometría (ver apartado 3.14.) con el fin de estudiar si se podían observar células fluorescentes correspondientes a TC. La otra alícuota sería utilizada para realizar sorting de las bacterias fluorescentes en caso de haber obtenido un resultado positivo en la

transferencia del plásmido. Ambas alícuotas se centrifugaron para quedarnos únicamente con los pellets que fueron congelados a -80 °C hasta su estudio por citometría.

3.11.2. Microbiota intestinal humana como población aceptora de los plásmidos conjugativos

Para poder estudiar también la diseminación de plásmidos utilizando como bacteriasceptoras las provenientes de la microbiota intestinal humana, se realizaron experimentos utilizando una muestra de heces recién obtenida de un individuo sano, así como las bacterias obtenidas tras cultivar la muestra de heces durante 6 días en medio CBA en condiciones anaeróbicas. Como células donadoras se utilizaron las cepas (CU583, CU585, CU753 y CU754), cepas de *E. coli* DH5 α Z1 conteniendo los plásmidos R388 o RP4 con las construcciones Ptet::sfgfp o Plac::sfgfp, con el fin de poder cubrir un mayor espectro de posibles conjugantes.

El proceso de cultivo de las bacterias, de contaje del número de células, las incubaciones, la recuperación de bacterias de la membrana de nitrocelulosa y la exposición a oxígeno, se realizaron de forma similar a lo descrito con el contenido cecal de ratón.

3.12. Recuento celular mediante cámara Neubauer

La cámara de Neubauer nos permite contabilizar mediante visualización por microscopía el número de células de una suspensión. Esto nos ayuda a saber la concentración tanto de nuestra muestra donadora como de la microbiota aceptora, pues la coloración de la población (i.e. contenido cecal) imposibilita el uso de otras técnicas como podría ser la medición de la absorbancia.

La cámara en cuestión, como se observa en la imagen de la figura M11, consiste en un portaobjetos que lleva marcada una cuadrícula de dimensiones conocidas. A partir del número de células contadas en la cuadrícula y conociendo el volumen de líquido que admite el campo de la retícula, se calcula la concentración de células en la muestra líquida aplicada.

La cuadrícula de recuento está formada por 9 cuadrados grandes de 1 mm^2 de superficie. Cada uno de ellos está dividido en su interior en 25 cuadrados medianos que se encuentran a su vez divididos en cuadrados más pequeños.

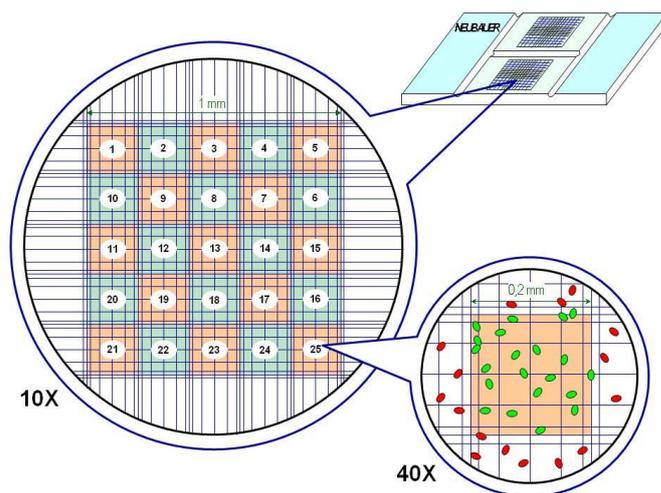


Figura M11. Representación esquemática de la cámara de Neubauer. El portaobjetos se encuentra dividido en dos cuadrículas, una superior y otra inferior, que se encuentran a su vez subdivididas en cuadrantes más pequeños de dimensiones conocidas para facilitar el recuento celular (figura obtenida de http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer_improved.ph)

El cálculo de la concentración de células (células/ μl) se puede expresar mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células contadas}}{[(\text{superficie contada (mm}^2) \times \text{profundidad de la cámara (mm)})] \times \text{dilución}}$$

Donde el número de células contadas será la media de 2 réplicas en las que contaremos las células de 8 cuadrados en zonas diferentes del portaobjetos. La superficie contada, en nuestro caso 8 cuadrados de 0,0025 mm² cada uno, supone una superficie total de 0,02 mm². La profundidad de la cámara es un valor conocido de 0,1 mm y se refiere a la altura que alcanza la muestra al colocarla bajo el cubreobjetos.

Conociendo estos valores podemos calcular, por ejemplo, el número de células / μl para una muestra de bacterias donadoras en la que la media de los dos recuentos realizados en la dilución 10⁻² es de 16 células.

$$\frac{16}{0.02 \times 0.1 \times 0.01} = 8 \times 10^5 \text{ células/ } \mu\text{l muestra.}$$

3.13. Experimentos con modelo de ratón

Todos los modelos de ratón fueron realizados con hembras de la cepa C57BL/6J de 6 semanas de edad provenientes de Charles River Laboratory (Francia) que fueron mantenidas con comida autoclavada y agua acidificada ad libitum. Los ratones estuvieron en la misma habitación y en el mismo rack, fueron mantenidos por el mismo personal que se cambiaba los guantes entre las manipulaciones de diferentes grupos y usaba material estéril para prevenir la transferencia de microorganismos entre jaulas.

Todos los procedimientos de los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices del Real Decreto RD 53/2013, bajo protocolos aprobados por el Comité de Bioseguridad y de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València describiendo experimentos específicos para este estudio.

3.13.1. Modelos de ratón utilizados para el estudio de la diseminación de EGM

En un primer momento, dado que para el estudio de la diseminación de EGM nos interesa que la microbiota intestinal del ratón esté lo menos perturbada posible y contenga la mayor diversidad bacteriana posible, se probó la colonización de los ratones con la cepa donadora (ver apartado 3.13.4 para la preparación de la bacteria), administrándola bien mediante sonda nasogástrica o en el agua de bebida, sin haber realizado un tratamiento previo con antibióticos (Figura M12 A y B).

Una vez vista la necesidad de utilizar antibiótico previo a la inoculación de la bacteria donadora (Resultados, apartado 4.1.5) y comprobada la colonización tras el uso de estreptomina (Figura M12C), se diseñaron un par de modelos que permitían la recuperación de la microbiota tras el cese de tratamiento antibiótico durante dos semanas (Figura M12 D y E). En el modelo E, además, se procede a realizar un trasplante fecal (TF) con microbiota de ratón para favorecer la recuperación bacteriana de la microbiota intestinal tras el tratamiento antibiótico.

Finalmente se testó un modelo en el que se acortó el tiempo de recuperación y se aplicó TF con microbiota humana (Figura M12F). En todos los modelos en los que se dejó de administrar antibiótico a los ratones, al menos unos días, con el fin de permitir la recuperación de su microbiota intestinal, se finalizó el experimento con la administración de un tratamiento que permitiera la expansión de aquellas bacterias que contienen el plásmido conjugativo (ver apartado 3.13.3.), de este modo se facilita la visualización de esta población, en general minoritaria, mediante la técnica de citometría de flujo.

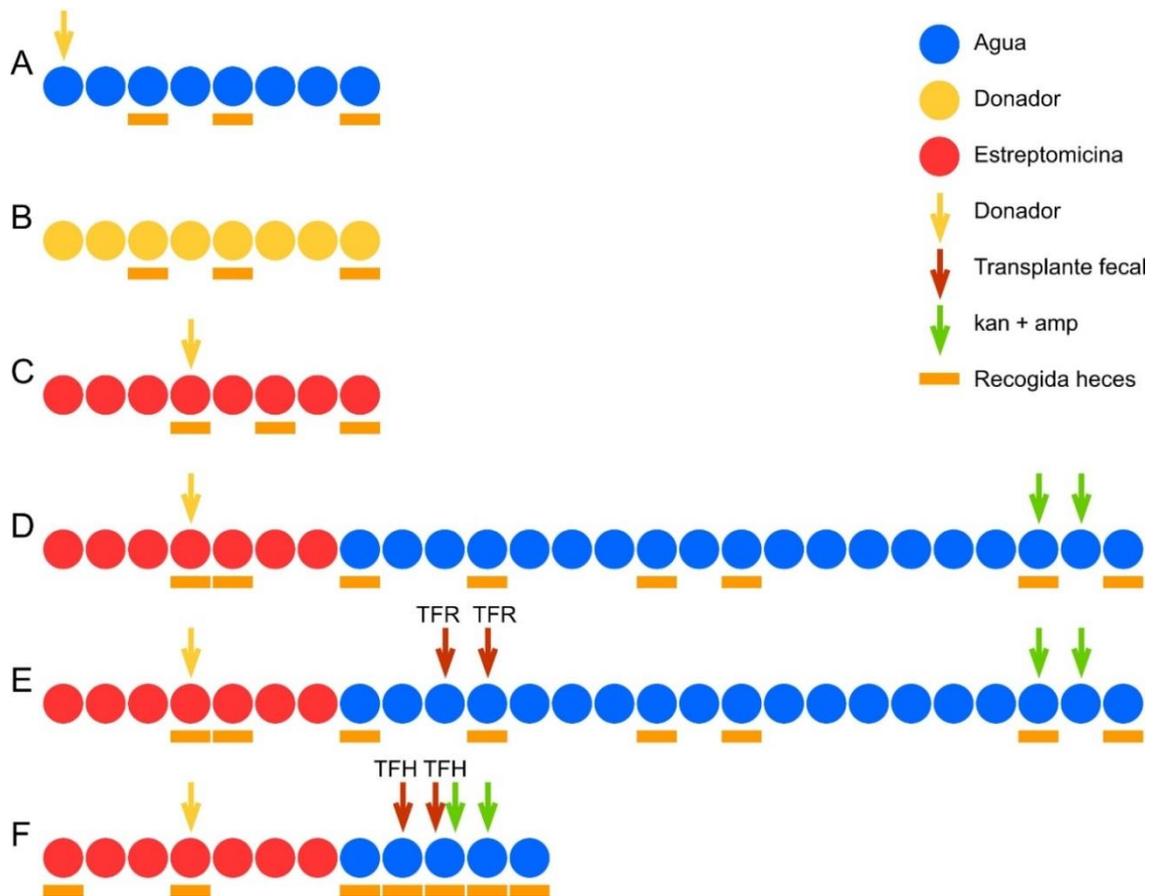


Figura M12. Esquema de los modelos de ratón utilizados para el estudio de diseminación de EGM *in vivo*. Cada círculo representa un día. Los colores de los círculos representan el contenido de los biberones de los ratones: agua sin antibiótico (azul), stp 5g/L (rojo), bacteria donadora de plásmido conjugativo en niveles de 5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFCs/ml) (amarillo). Las flechas representan la administración mediante sonda nasogástrica de bacterias o algún tratamiento a los ratones: inoculación de 10^6 UFCs de la bacteria donadora de plásmido (amarillo), administración de una suspensión de bacterias fecales, también llamado trasplante fecal (TF) provenientes de ratón (TFR) o de humano (TFH) (marrón), administración de antibiótico (20mg/ml de kan + amp) para la expansión de las poblaciones portadoras de plásmido conjugativo (verde). Los rectángulos indican el momento en que se recogieron muestras de heces para cultivar y/o llevar a citometría. **(A)** Los ratones son inoculados con una única dosis de la bacteria donadora mediante sonda nasogástrica sin recibir ningún tratamiento antibiótico. **(B)** Los ratones reciben bacteria donadora en el agua de bebida sin recibir ningún tipo de antibiótico. **(C)** Los ratones son inoculados con bacteria donadora tras 3 días de tratamiento con stp, el cual se continúa durante todo el experimento. **(D)** Los ratones son inoculados con bacteria donadora tras 3 días de tratamiento con stp. 4 días más tarde se detiene el tratamiento para dejar un par de semanas de recuperación de la microbiota intestinal. Finalmente se administra kan y amp para expandir las bacterias que tienen plásmido conjugativo. **(E)** Mismo modelo que D, pero los ratones reciben TFR para mejorar la restauración de la microbiota tras el tratamiento con stp. **(F)** Mismo modelo que E, pero usando heces humanas frescas para el TF y dejando un menor tiempo de recuperación de la microbiota tras el tratamiento con antibiótico.

3.13.2. Modelos de ratón utilizados para el estudio de los efectos de la DO en colonización por patógenos multirresistentes

Partimos de la hipótesis que la disbiosis intestinal causada por la ingesta de una dieta rica en grasas y azúcares simples (dieta occidental, DO) podría favorecer la expansión de patógenos multirresistentes y por ende la transmisión de EGM que contuviesen genes de resistencia a antibióticos (GRAs). Para testar los efectos de este tipo de dieta, se administró *ad libitum* la dieta occidental SF230HF de Panlab, caracterizada por tener sacarosa como fuente principal de carbohidratos (34,96% del total de la dieta) y altos niveles de grasa (36%). Como control, un grupo de ratones recibió dieta convencional (DC) con un menor nivel de grasa (3,1%) y en la cual la principal fuente de carbohidratos es el almidón, un azúcar complejo que promueve el crecimiento de bacterias comensales anaeróbicas.

Inicialmente se inocularon 5×10^8 UFCs de *E. coli* (ver apartado 3.13.4. para la preparación de la bacteria) en ratones alimentados durante 8 semanas con DC o DO (modelo similar a Figura 13A) para estudiar el efecto de la dieta en la colonización intestinal de este patógeno y en la diseminación de plásmidos conjugativos con genes de resistencia a antibióticos. Al observar que los ratones alimentados con DO, al igual que los alimentados con DC, mostraban resistencia a la colonización por *E. coli*, se repitieron los experimentos con un patógeno diferente, VRE para el cual, los ratones alimentados con DO sí perdían la resistencia a la colonización.

Po tanto, la inoculación de VRE (ver apartado 3.13.4. para la preparación de la bacteria) se testó directamente después de las 8 semanas de alimentación con DO (Figura 13A) o bien tras un retorno de 2 semanas a DC (Figura 13B) con el objetivo de estudiar el grado de persistencia de los cambios producidos en la microbiota intestinal por la DO y su efecto en la colonización por patógenos multirresistentes.

Para el estudio de la heredabilidad de los cambios inducidos por la DO se utilizó la primera generación descendiente de ratonas alimentadas con este tipo de dieta. Tras el destete, las crías recibieron DC o DO durante 8 semanas antes de ser inoculadas con el patógeno (Figura 13C).

Por último, para intentar separar el papel de la dieta *per se* de los cambios producidos por la DO en la microbiota intestinal a la hora de favorecer la colonización por VRE, ratones sometidos a antibioterapia (ver apartado 3.13.3.) para eliminar gran parte de su microbiota y que son alimentados exclusivamente con DC, recibieron un trasplante fecal procedente de ratones alimentados bien con DC, bien con DO, antes de inocularles el patógeno (Figura 13D).

Inmediatamente antes de la inoculación de VRE, en todas las ocasiones se recogieron muestras fecales para el análisis de la microbiota, las cuales fueron congeladas inmediatamente en hielo seco y guardadas a -80 °C hasta el momento de su procesado. Dos días después de la inoculación, los niveles de VRE fueron determinados mediante el cultivo de diluciones seriadas de muestras fecales en placas de BEA con 8 µg/ml de vancomicina y 10 µg/ml de ampicilina. Como control, se cultivaron en el mismo medio de cultivo heces de los ratones antes de la inoculación de VRE. Como cabía esperar, el crecimiento de esas muestras no dio lugar a ninguna UFC en el medio selectivo.

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

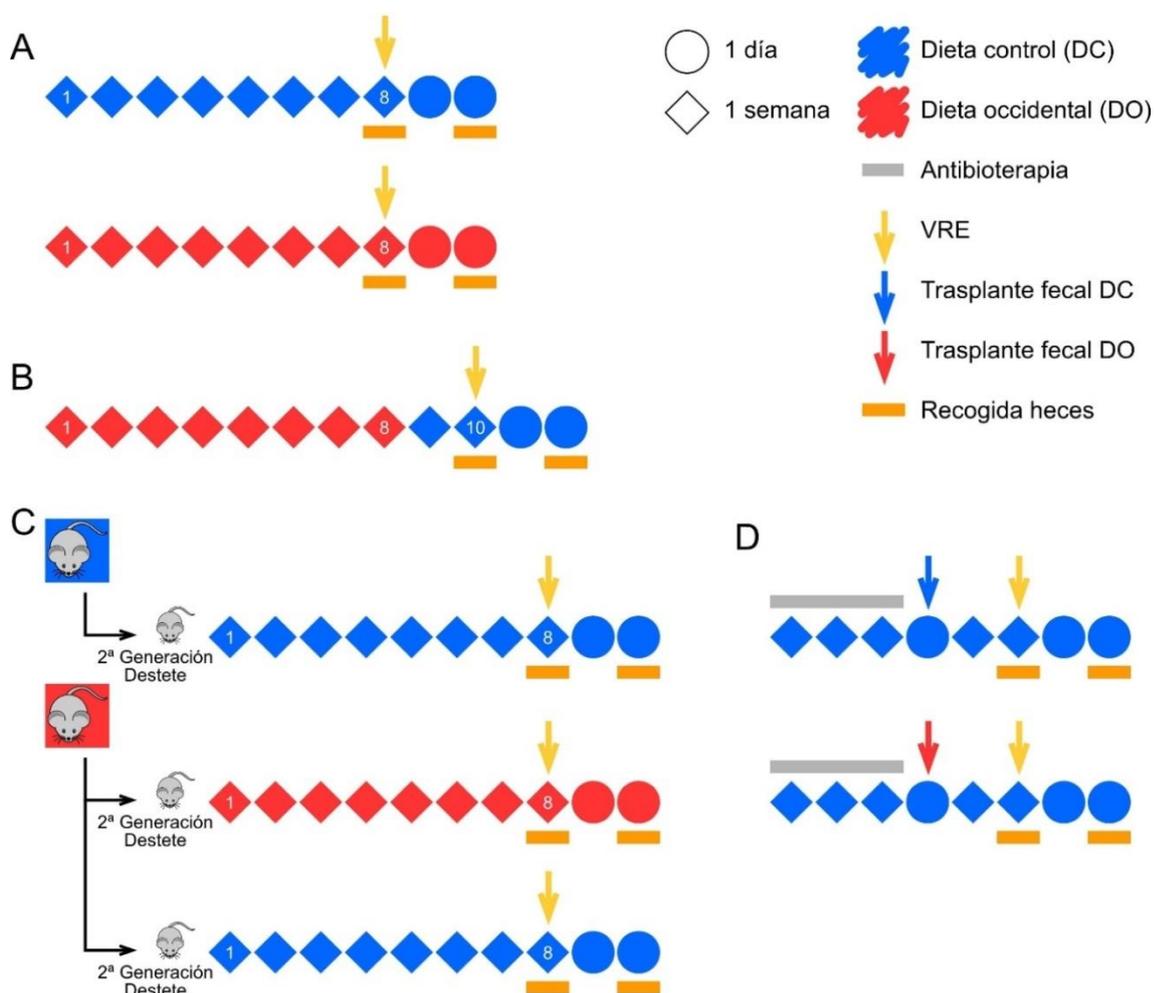


Figura M13. Esquema de los modelos de ratón utilizados para el estudio del efecto de la Dieta Occidental (DO) en la colonización por VRE. Cada rombo representa una semana, y cada círculo un día. Los colores indican el tipo de dieta administrada a los ratones: DC (azul), DO (rojo). Las flechas representan la administración mediante sonda nasogástrica de bacterias o algún tratamiento a los ratones: inoculación de 10^6 UFCs de VRE (amarillo), administración de una suspensión de bacterias fecales, también llamado trasplante fecal (TF) proveniente de ratones alimentados durante 8 semanas con DC (rojo) o DO (azul). Los rectángulos grises indican la administración de antibioterapia para eliminar la microbiota de los ratones. Los rectángulos naranjas indican el momento en que se recogieron muestras de heces para cultivar o secuenciar. **(A)** Los ratones recibieron DC o DO durante 8 semanas. Transcurrido este tiempo se secuenció su microbiota fecal y se inocularon 10^6 UFCs de VRE. Los niveles del patógeno se detectaron en heces dos días después de la inoculación. **(B)** Tras 8 semanas de alimentación con DO, los ratones pasaron a ser alimentados con DC durante 2 semanas. Transcurrido este tiempo se secuenció su microbiota fecal y se inocularon 10^6 UFCs de VRE. Los niveles del patógeno se detectaron en heces dos días después de la inoculación. **(C)** Tras el destete, la descendencia de madres alimentadas con DC o DO fue alimentada durante 8 semanas con uno de los dos tipos de dieta. Transcurrido este tiempo se secuenció su microbiota fecal y se inocularon 10^6 UFCs de VRE. Los niveles del patógeno se detectaron en heces dos días después de la inoculación. **(D)** Ratones a los cuales se les eliminó casi en su totalidad la microbiota intestinal mediante un tratamiento antibiótico de 3 semanas (ver apartado 3.13.3.) y que fueron en todo momento alimentados con DC, recibieron una única

dosis de trasplante fecal de heces procedente de ratones alimentados con DC o DO durante 8 semanas. Dos semanas después, se recogieron heces para secuenciar su microbiota fecal y se inocularon 10^6 UFCs de VRE. Los niveles del patógeno se detectaron en heces a los dos días tras la inoculación.

3.13.3. Tratamiento con antibióticos

Para permitir la colonización de la bacteria donadora de plásmido conjugativo (*E. coli*) en el intestino de ratón, se utiliza un tratamiento con 5 g/l de estreptomicina diluidos en el agua de bebida durante una semana con el objetivo de eliminar parte de la microbiota intestinal del ratón y suprimir así la resistencia natural a la colonización por bacterias exógenas que presentan estos animales. Los biberones con el tratamiento se renuevan cada 3-4 días para evitar que el antibiótico pierda actividad.

En aquellos modelos en los que se procedió a la expansión de las bacterias portadoras de plásmido conjugativo, se administró a los ratones mediante sonda nasogástrica 2 dosis al día consistentes en 100 μ l de una preparación que contenía 10 mg/ml de amp y 10 mg/ml de kan durante dos días consecutivos.

Con el objetivo de eliminar la mayor parte de la microbiota intestinal de ratones que fueron posteriormente trasplantados con microbiota fecal de ratones alimentados con distintos tipos de dietas, se siguió la antibioterapia descrita por Staley y colaboradores (21). Los antibióticos se prepararon a una concentración de 1 mg/ml cada uno en agua de bebida. Se administraron dos cócteles diferentes, el cóctel de “elevada absorción” compuesto por antibióticos con un alto grado de absorción sistémica: sal sódica de ampicilina (AppliChem Co.), sal sódica de cefoperazona (Thermo Fisher Scientific Co.), y clorhidrato de clindamicina (Thermo Fisher Scientific Co.) y un cóctel “no absorbible” compuesto por antibióticos con poca capacidad de absorción sistémica: ertapenem sódico (Rosco Diagnostica Co.), sulfato de neomicina (Thermo Fisher Scientific Co.), e hidrocloreuro de vancomicina (Thermo Fisher Scientific Co.).

La pauta de administración de los antibióticos podemos seguirla en la figura M14.

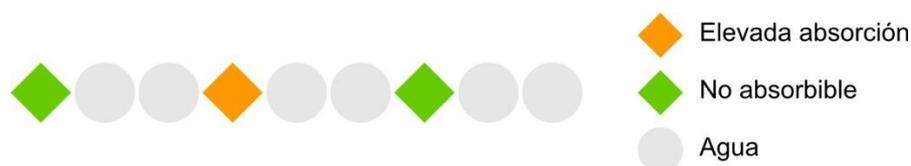


Figura M14. Posología del tratamiento antibiótico para eliminar la mayor parte de la microbiota intestinal de ratones. Los círculos representan días y los rombos semanas. El color indica el tipo de cóctel antibiótico administrado, de elevada absorción sistémica (naranja) o no absorbible (verde). Se administró el cóctel de antibióticos no absorbibles (ertapenem, neomicina y vancomicina) durante una semana seguido de una segunda semana del cóctel de elevada absorción sistémica (ampicilina, cefoperazona y clindamicina) y una última semana en la que nuevamente se administra el cóctel no absorbible. Entre los cambios de cóctel, los ratones permanecieron durante 2 días con agua de bebida sin antibiótico en sus biberones.

3.13.4. Inoculación de la bacteria de interés

La bacteria *E. coli* fue elegida bacteria donadora para este estudio ya que se trata de un hospedador habitual de una gran cantidad de plásmidos que contienen resistencia a antibióticos. Se trata de un patógeno oportunista, que se puede encontrar de forma natural en la microbiota intestinal pero que puede causar infecciones graves si consigue pasar al torrente sanguíneo. En nuestro caso, la cepa *E. coli* DH5 α Z1, contiene en su genoma el represor para los promotores Plac y Ptet. Como plásmido conjugativo seleccionamos el plásmido RP4::Ptet::sfgfp, ya que en los experimentos *ex vivo* tanto con microbiota intestinal murina como humana, se obtuvo una mayor eficiencia de conjugación con este plásmido que con el R388 (Resultados, Figura R10B, R16B, R17B).

La bacteria donadora de cada experimento fue crecida *o.n.* a 37 °C en medio LB agar. A la mañana siguiente se resuspendió el cultivo en PBS con ayuda de una torunda de algodón estéril. Para las inoculaciones mediante sonda nasogástrica se administró una única dosis de 10⁶ UFCs de *E. coli* en 200 μ l de volumen total por ratón. Para la inoculación usando el agua de bebida, la concentración de bacteria que se utilizó fue 5x10⁸ UFCs/ml. En el caso de los modelos de ratón que utilizan estreptomina para favorecer la colonización intestinal, las bacterias utilizadas como donadoras eran resistentes a dicho antibiótico (stp^R).

Para el estudio de los efectos de la dieta en la colonización por patógenos y en la diseminación de plásmidos conjugativos se pretendía usar también *E. coli* DH5 α , en concreto la cepa CU9, con un marcador de resistencia a cloranfenicol insertado en su genoma (se preparó del mismo modo que ya hemos comentado, pero se administraron 10⁸ UFCs en 200 μ l a cada ratón). La falta de colonización intestinal de los ratones hizo que finalmente trabajásemos con VRE, un patógeno oportunista de gran relevancia clínica debido a sus resistencias a antibióticos. Para los experimentos con VRE, la bacteria fue crecida *o.n.* a 37 °C en 20 ml de BHI. Al día siguiente se diluye el cultivo en PBS para administrar, mediante sonda nasogástrica, una única dosis de 10⁶ UFCs de VRE en 200 μ l de volumen total por ratón.

3.13.5. Trasplante Fecal

Con el objetivo de restaurar la microbiota del ratón una vez cesado el tratamiento antibiótico, de modo que la bacteria donadora pudiese transferir el plásmido a una mayor diversidad de bacterias de la microbiota intestinal, se realizaron trasplantes fecales (TF) con heces de ratón o humanas según el modelo utilizado.

En el caso del TF con microbiota de ratón, se recogieron pellets de heces de 2 ratones que no habían sido tratados con antibióticos y se resuspendieron en 2 ml de PBS con 15% de glicerol. El tubo se congeló en un baño de etanol y hielo seco y se mantuvo a -80 °C hasta el momento de su utilización en el que se administraron 200 μ l de la suspensión a cada ratón.

Para el TF humano se utilizaron heces frescas de un individuo sano que no hubiese recibido tratamiento antibiótico al menos un mes previo al estudio. Las heces se resuspendieron en 1:1 p/v en PBScys y se transportaron hasta las instalaciones del animalario en condiciones de anaerobiosis para intentar mantener la supervivencia del mayor número de especies bacterianas posible. Una vez en las instalaciones se administraron 200 μ l de la suspensión a cada ratón.

En el caso del estudio del efecto de la dieta en la colonización por VRE, los trasplantes fecales con microbiota de ratón se realizaron del mismo modo que ya se ha descrito. Se recogieron heces de ratones alimentados bien con DC, bien con DO, que fueron resuspendidas en PBS con glicerol y mantenidas en $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3.14. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células que consideraremos una muestra representativa del conjunto poblacional. Un sistema de fluidos envolvente alinea y transporta las células hacia un sistema óptico compuesto por láseres y filtros que se encargan de iluminar a las células y dirigir las señales resultantes hacia los detectores apropiados.

Las células tienen la capacidad de dispersar la luz incidente de acuerdo con su tamaño y su complejidad. La dispersión frontal de la luz incidente en la célula nos indica el tamaño de ésta en un parámetro que llamamos forward scatter (FSC), mientras que la dispersión lateral, side scatter (SSC-A), indica la complejidad (granularidad, rugosidad) de la misma. Por otro lado, si las células disponen de algún componente fluorescente, emitirán luz en una longitud de onda mayor de aquella a la que han sido excitadas, lo que nos proporciona información biológica adicional que puede estar relacionada con la actividad metabólica, el contenido en ADN, la presencia de determinados marcadores individuales o de superficie, etc. En nuestro caso, la fluorescencia indicará la adquisición de un plásmido conjugativo que codifica genes que expresan proteínas fluorescentes. El sistema óptico, gracias a los distintos filtros de los que dispone, recoge tanto la luz dispersada como la fluorescencia emitida por cada partícula y esta información es posteriormente convertida en una señal digital que podemos analizar.

En nuestro caso, el pellet de células fue transportado en hielo y oscuridad hasta el servicio de citometría de la Universidad de Valencia, donde utilizamos el citómetro LSRFortessa BECTON DIKSON, o al servicio del Instituto de Salud del Hospital La Fe en

el que se utilizó el separador celular FACS Aria-III (Becton Dickson). Una vez en el servicio de secuenciación, el pellet se resuspendió en 1 ml de Solución Salina estéril. En caso de tratarse de una muestra con restos fecales (bien humanos o de ratón), la solución fue filtrada con un filtro de 50 μm de la casa comercial BD BIOSCIENCES para evitar posibles obturaciones del citómetro.

La población total bacteriana se definió y separó del ruido de fondo y de partículas pequeñas enfrentando en un gráfico bidimensional el área de Forward scatter (FSC-A) y el área de Side scatter (SSC-A). Los eventos considerados como bacterias se seleccionaron y visualizaron nuevamente en un gráfico bidimensional que enfrenta tanto el área (FSC-A) como la altura (FSC-H) de la señal fluorescente. Consideramos como singletes, bacterias no agregadas, a aquellos eventos en los que el ratio FSC-A:FSC-H era aproximadamente de 1.

Una vez delimitada la población bacteriana no agregada, procedimos a contabilizar o separar aquellas bacterias que emiten fluorescencia verde, por lo que los singletes excitados con el láser 488 nm se visualizaron en un histograma que enfrentaba el área de la señal recibida por el detector FITC ($\lambda = 530 \pm 30 \text{ nm}$) vs. el número de eventos (*counts*). Las células positivas para FITC fueron verificadas, en el caso de los experimentos *ex vivo* e *in vivo*, en un canal fluorescente diferente llamado AmCyan ($\lambda = 510 \pm 50 \text{ nm}$) que se excita a 375 nm. Para su visualización se usa un gráfico bidimensional que enfrenta el área de AmCyan vs. SSC-A. Los eventos positivos tanto para FITC como para AmCyan (FITC+; AmCyan+) fueron considerados como autofluorescentes, mientras que los positivos para FITC y negativos para AmCyan (FITC+; AmCyan -) fueron considerados TC que están expresando la proteína fluorescente. De manera rutinaria, cada vez que se quiso comprobar la fluorescencia de una muestra en el citómetro, se incluyeron controles tanto positivos como negativos para poder ajustar los umbrales de fluorescencia de acuerdo con la fluctuación diaria del sistema.

Podemos ver un ejemplo de la estrategia descrita en la figura M15.

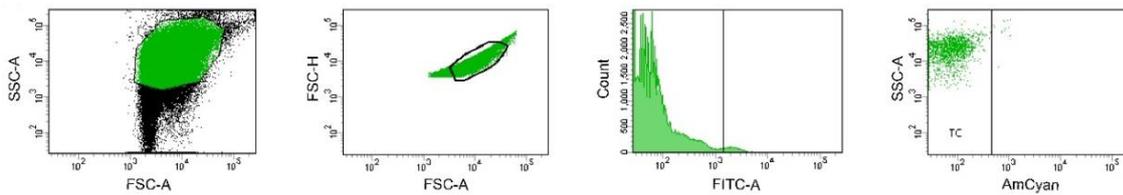


Figura M15. Esquema general de citometría utilizado para testar los experimentos *ex vivo* e *in vivo* ejemplificado con una muestra en la que observamos transconjugantes. En primer lugar, se seleccionaron los eventos detectados según las características de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) esperados para bacterias. A continuación, se eliminan los agregados enfrentando en un gráfico el área (FSC-A) y la altura (FSC-H) de la señal fluorescente; se consideran singletes aquellos que cumplen una proporción 1:1 entre área y altura. Después se visualizan las bacterias en el canal FITC-A ($\lambda = 530 \pm 30$ nm) para el que esperamos ver señal fluorescente, las células positivas se analizan en un segundo canal fluorescente, AmCyan ($\lambda = 510 \pm 50$ nm). Si la señal es también positiva en AmCyan consideraremos que estamos ante células autofluorescentes, mientras que si la señal es negativa consideraremos que son TC.

3.15. Separación celular (“sorting”)

La separación celular de las bacterias transconjugantes y de los controles se realizó en la Universidad de Copenhague en colaboración con el Dr. Sorensen, usando el separador celular FACS Aria-III (Becton Dickson). Los pellets de las distintas muestras se enviaron en hielo seco y se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de la separación. Previamente se había comprobado que la congelación a esta temperatura no afectaba a la fluorescencia.

El proceso de separación celular se realizó utilizando los mismos láseres descritos para la metodología de citometría y siguiendo el procedimiento de 4 ventanas descrito también en la figura M15.

Las muestras fueron diluidas en PBS hasta una concentración de 1000-2500 eventos por segundo para garantizar una separación óptima. Las células fluorescentes separadas se depositaron en tubos estériles de poliestireno con 0,5 ml de PBS estéril. Un esquema del proceso de separación celular puede observarse en la figura M16.

Teniendo en cuenta que los TC suelen representar menos de 1% de las células recuperadas de los filtros de conjugación, para acelerar el proceso de separación celular se utiliza un protocolo de doble sorting, tal y como se describe en el artículo de

de diseminación de plásmidos a bacterias de suelo (6). El doble sorting consiste en hacer una primera separación, menos restrictiva (usando un voltaje de FITC más elevado) pero más rápida, de modo que se separan un total de 100000 supuestos eventos TC, enriqueciendo alrededor de un 80 % las poblaciones de TC por número total de eventos analizados. Para eliminar los posibles falsos positivos que hayan podido quedar y garantizar la pureza de la muestra, se hace un segundo sorting de la población separada, en condiciones más restrictivas (bajando el voltaje de FITC).

Las células TC separadas, se prepararon seguidamente para la extracción de ADN y la amplificación del gen 16S rRNA como podemos ver en los apartados 3.3.3. y 3.16.

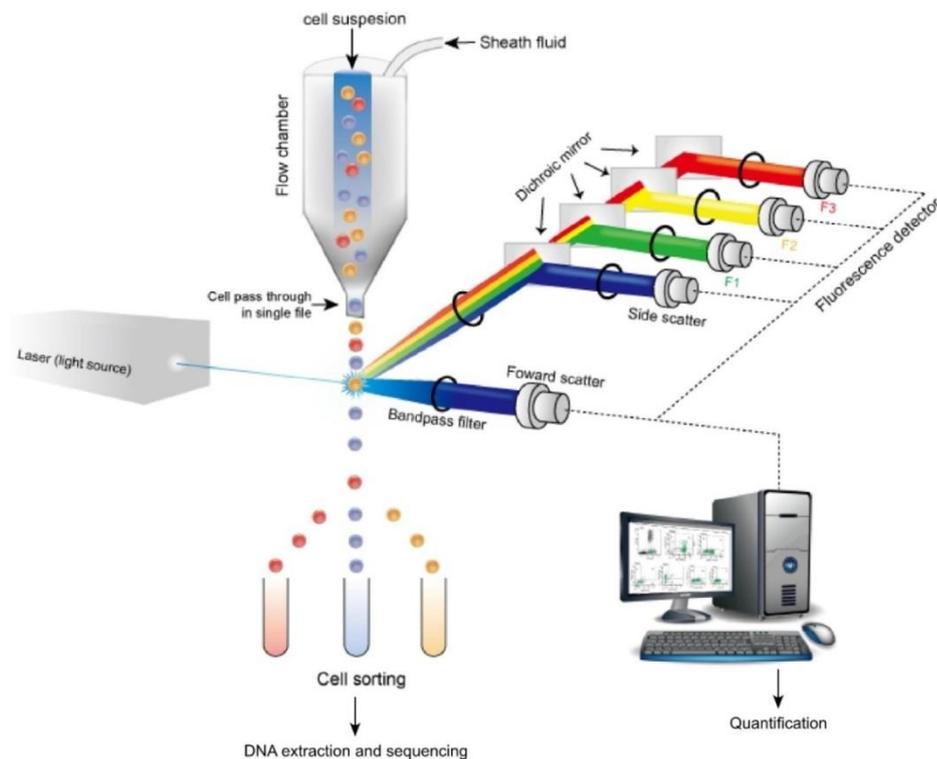


Figura M16. Esquema general del proceso de citometría y separación celular que siguen las bacterias desde el cultivo hasta su secuenciación. La suspensión bacteriana que se quiere analizar, diluida en PBS, se introduce en el citómetro donde las bacterias se alinean y pasan frente a un láser que las ilumina de forma individual en la longitud de onda previamente establecida. Una serie de detectores se encargan de recoger la señal luminosa emitida por las células que nos aportan información sobre su tamaño, complejidad y fluorescencia. Esta información permite, por un lado, la cuantificación digital de las bacterias de interés y/o su separación física para la recuperación en condiciones de esterilidad. Una vez recuperadas las bacterias se procedió a la extracción de su ADN para la posterior secuenciación y análisis del gen 16S rRNA. Imagen adaptada de: http://2018.igem.org/Team:SUSTech_Shenzhen/Methods

3.16. Secuenciación masiva mediante la tecnología Illumina

3.16.1. Secuenciación del gen 16S rRNA mediante la plataforma MiSeq de Illumina

La región V3-V4 del gen 16S rRNA se amplificó y secuenció en el servicio de secuenciación de la Universidad de Copenhague en el caso del estudio de diseminación de plásmidos conjugativos o en el servicio de secuenciación de FISABIO en el caso del estudio del efecto de la dieta en la colonización intestinal de patógenos. En ambos servicios utilizaron la plataforma MiSeq de Illumina, como se describe en el manual “16S Metagenomics Sequencing Library Preparation” (Illumina).

Brevemente, para cada muestra, se preparó una reacción de 25 µl que contenía 12,5 ng de ADN, 12,5 µl del Mix KAPA HiFi Hot Start, 0,2 mM de la pareja de cebadores 341F y 806R (para el estudio de diseminación de plásmidos conjugativos) o la pareja 16S-F y 16S-R (para el estudio del efecto de la dieta en la microbiota intestinal) (ver tabla M4) y agua hasta completar el volumen de la reacción. En caso de no haber suficiente cantidad de ADN, se añadió el volumen máximo posible a la reacción y se incrementaron los ciclos de amplificación de 25 a 30. Las condiciones de cada ciclo fueron:

- 95 °C durante 3 min
- 25 ciclos (30 en caso de baja concentración de ADN) a 95 °C durante 30 seg, 55 °C durante 30 seg y 72 °C durante 30 seg
- y una elongación final de 72 °C durante 5 min.

El resultado de la amplificación se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa, cargando 4 µl de la reacción de PCR obtenida en un gel de 1,6% de agarosa. A continuación, el producto de PCR se purificó con el kit AMPure XP beads como se describe en el protocolo de Illumina.

Después se realizó una reacción de PCR con pocos ciclos para añadir los índices a ambos extremos del ADN, lo que permitió la secuenciación de los pools de librerías. Esta PCR para introducir los índices consiste en una reacción de 50 µl que contiene 5 µl de la PCR obtenida previamente, 25 µl del Mix 2x KAPA HiFi Hot Start y 5 µl de los

cebadores indexados directo y reverso (presentes en el kit de Illumina). Las condiciones de temperatura son las mismas que para la primera reacción, pero el número de ciclos se reduce a 8. El producto de PCR obtenido se purificó con AMPure XP beads siguiendo el protocolo comercial. Para cada una de las muestras del pool se utilizó la misma cantidad de ADN purificado y se secuenció siguiendo las recomendaciones de Illumina.

3.16.2. Secuenciación del genoma completo bacteriano mediante la plataforma NextSeq™ 500 de Illumina

El genoma completo de los aislados clínicos se secuenció en el servicio de secuenciación de FISABIO usando la plataforma NextSeq™ 500 de Illumina que genera secuencias de 150 pb.

En primer lugar se preparan las librerías que permiten tanto la adhesión del ADN a la celda de flujo donde ocurre el proceso, como la identificación de las muestras a secuenciar. En la preparación de las librerías hay un primer paso, conocido con el nombre de “tagmentación” en el que se fragmenta el ADN genómico a la vez que se produce la ligación de los adaptadores (permite la adhesión a la celda de flujo). Posteriormente, los índices (secuencias únicas que permiten la identificación de las muestras) se unen a los adaptadores mediante PCR. Los oligonucleótidos directo y reverso se unen a los adaptadores y puede comenzar la secuenciación.

Se realizó una primera secuenciación de las muestras que, por algún motivo que desconocemos, resultó en lecturas de muy baja calidad (Resultados, Figura R26) de las que pocas se podían utilizar, por lo que se decidió repetir la secuenciación reutilizando las librerías. En este caso los resultados fueron mucho mejores en términos de calidad (Resultados, Figura R26). No obstante, las muestras 257 y 776 (ver tabla M5) seguían teniendo un bajo número de secuencias por lo que en este caso se concatenaron las lecturas obtenidas tanto en la primera como en la segunda secuenciación para intentar mejorar la calidad y el número de las mismas y poder utilizarlas en nuestro análisis.

3.17. Análisis de la secuenciación del gen 16S rRNA

3.17.1. Filtrado de las secuencias

Tras la secuenciación y con el objetivo de corregir los posibles errores de secuenciación producidos por Illumina, se aplica el paquete de software DADA2 v1.11 (145) que incluye “*pipelines*” para el filtrado de las secuencias según la calidad de estas, el emparejado de las secuencias directa y reversa, la identificación y eliminación de quimeras, y la detección y eliminación de las secuencias que alinean frente al hospedador. Inicialmente se eliminaron todas aquellas secuencias inferiores a 300 nt, así como los últimos 35 nt de la secuencia directa y los últimos 75 nt de la secuencia reversa por presentar normalmente una menor calidad. Posteriormente se eliminaron aquellas secuencias de baja calidad con un maxEE (error máximo esperado) > 5. Este error se calcula mediante la fórmula: $\sum(10^{-Q/10})$, siendo Q el valor dado por la plataforma Illumina para cada base secuenciada. Cuanto menor es el valor de Q, menor es la calidad de dicho nucleótido. Posteriormente se eliminaron las secuencias quiméricas, artefactos de la PCR generados de la fusión de dos amplicones del gen 16s rRNA, y finalmente, DADA2 aplicó un algoritmo basado en “machine learning” con el fin de identificar errores derivados del proceso de secuenciación. Tras este procesado de las lecturas, obtenemos una tabla con las “variantes únicas de amplicón – amplicon sequences variants - ASVs”. Es decir, todos aquellos amplicones identificados con diferente secuencia y el número de veces que se repiten en cada muestra. Finalmente, cada secuencia se clasificó taxonómicamente, generalmente hasta el nivel de género, utilizando la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) y el clasificador RDP (146).

Como control del proceso, además de las células fluorescentes separadas, también se extrajo ADN y se secuenció el PBS que fluye por los conductos del citómetro y que se utiliza en los tubos de recogida de células, y el agua del kit de extracción de ADN. Por otro lado, también se secuenció el control negativo de la primera PCR de secuenciación para descartar una posible contaminación. Las ASVs detectadas en estos controles negativos fueron eliminadas del análisis excepto en el caso de que la media de la abundancia de dicha ASV en las muestras de las poblaciones

aceptoras o transconjugantes fuese más de 5 veces superior a la abundancia máxima de esa misma ASV en los controles negativos. En estos casos se asumió que podía haber existido una contaminación de los controles negativos con bacterias procedentes de las muestras aceptoras o transconjugantes y que si las elimináramos, estaríamos eliminando ASVs que podrían tener relevancia en nuestro análisis.

La diversidad de las muestras, representada con el índice de Shannon, fue calculada utilizando el paquete de R `vegan` v2.5-3 utilizando el mismo número de secuencias por muestra.

3.17.2. Análisis de Coordenadas Principales y Agrupación jerárquica

Con el objetivo de comparar la similitud global de las diferentes muestras de microbiota se calculó la distancia UniFrac (unique fraction metric) que mide la similitud entre las muestras teniendo en cuenta las ASVs identificadas en cada muestra y la distancia filogenética entre ellas.

Existen dos variantes de esta medida, “weighted” en la que se tiene en cuenta la abundancia relativa de las ASVs detectadas, y “unweighted” que solo tiene en cuenta la presencia o ausencia de las ASVs (147). Las distancias se calcularon utilizando el paquete de R `GUniFrac` aplicado sobre un árbol filogenético construido con las secuencias de ASVs y el paquete `phangorn` de R.

A la matriz de distancias obtenida se le aplicó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) usando el paquete `vegan` de R para agrupar muestras a lo largo de los ejes ortogonales de máxima varianza.

3.17.3. Análisis estadísticos

Las diferencias en la abundancia relativa de los taxones han sido analizadas mediante el Análisis de la composición de microbiomas (ANCOM) (148). Este test estadístico tiene en cuenta las limitaciones composicionales para reducir el ratio de

falsos descubrimientos. Su uso está recomendado para el estudio del microbioma, ya que los datos en este tipo de análisis suelen presentar un exceso de ceros que impide su correcto análisis estadístico por otros métodos. El análisis se aplicó a diferentes niveles filogenéticos de las muestras (filo, familia, género y ASV). Se aplicó la aproximación de “False Discovery Rate (FDR)” (149) para ajustar el p valor de las múltiples hipótesis testadas.

Para el análisis de la composición global de la microbiota se utilizó el test PERMANOVA basado en la distancia UniFrac y para detectar asociaciones entre variables continuas se utilizó el test de correlación de Spearman. De nuevo, se aplicó la aproximación FDR para ajustar el p valor en el caso de que se testaran múltiples hipótesis.

El test de Fisher de dos colas se ha aplicado para detectar las diferencias significativas en el porcentaje de ratones colonizados por VRE en los diferentes grupos, mientras que el test de Wilcoxon de dos colas ha sido aplicado para detectar diferencias en variables continuas entre diferentes grupos de muestras (i.e. niveles de VRE, índice de Shannon, número de ASVs).

Los cambios con un p valor $< 0,05$ y un q valor (p valor ajustado mediante FDR) $< 0,1$ se han considerados como estadísticamente significativos.

3.18. Análisis de la secuenciación del genoma completo bacteriano

3.18.1. Análisis de calidad y filtrado de las secuencias

Para el control de la calidad de las secuencias obtenidas el primer paso consistió en la obtención de un informe, utilizando el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), de los parámetros básicos de calidad, como las millones de lecturas obtenidos por cada muestra, su longitud, el porcentaje de GC entre otros. Además, el uso de MultiQC (150) nos permite agrupar los informes obtenidos de cada una de las muestras en un único documento.

El siguiente paso consistió en limpiar las secuencias para eliminar los adaptadores y aquellas secuencias de baja calidad utilizando PRINSEQ (151). Se eliminaron aquellas secuencias menores de 120 pb y con una media inferior a 25 en el parámetro de calidad Phred (Q) (24), relacionado con la probabilidad de que haya habido un error en el nucleótido asignado. Adicionalmente, se eliminaron 3 nt del inicio de la secuencia y todos aquellos nucleótidos con $Q < 20$.

Con el objetivo de identificar los aislados y asegurarnos de que habían sido correctamente identificados se utilizó KmerID (<https://github.com/phe-bioinformatics/kmerid>). Este software es capaz de fragmentar las lecturas en secuencias cortas de k-nucleótidos (k-meros) y mapearlas frente a diferentes genomas de referencia de una base de datos previamente descargada, identificando aquella bacteria de mayor similitud con nuestra muestra.

3.18.2. Reconstrucción del genoma de las enterobacterias

La reconstrucción de los genomas a partir de las lecturas obtenidas mediante la secuenciación puede realizarse de dos formas diferentes, mediante el ensamblado de las lecturas (ver apartado 3.18.2.1) o mediante el mapeo contra un genoma de referencia (3.18.2.2.).

3.18.2.1. Ensamblado del genoma

Para reconstruir el genoma de las enterobacterias, se utilizó el programa Unicycler (152) que utiliza las lecturas filtradas para, localizando las regiones solapantes, ordenar y ensamblar las secuencias en distintos contigs. La anotación de estas lecturas ensambladas o contigs se realizó mediante Prokka (153) y su calidad fue comprobada utilizando QUAST (154) que proporciona un informe con parámetros de calidad relevantes como el número de contigs en cada muestra, la longitud media, el tamaño de genoma ensamblado, el contenido en GC, etc.

3.18.3. Mapeo de las lecturas frente a un genoma de referencia

Con el fin de reconstruir el genoma de las diferentes cepas, se mapearon las secuencias filtradas contra el genoma de referencia de cada una de las especies identificadas. Los genomas de referencia utilizados en cada caso fueron:

- *Ehormaechei*_GCF_000328885.1_SOAPdenovo_genomic (Referencia en NCBI: NZ_ANID00000000.1)
- *Klebsiella oxytoca* cepa NCTC13727 (Referencia en NCBI: NZ_LR134333.1)
- *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* HS11286 (Referencia en NCBI: NC_016845.1)
- *Ecoli*_GCF_000005845.2_ASM584v2_genomic (Referencia en NCBI: NC_000913.3)

Tanto el genoma de referencia de *K. oxytoca* como el de *K. pneumoniae* fueron curados de los fagos que contenían utilizando PHASTER (155). La eliminación de los fagos es importante puesto que estas regiones contienen un elevado número de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) contiguos que pueden aportar falsos positivos en la asignación de variantes.

Se utilizó el programa Snippy (156) tanto para mapear las secuencias filtradas frente a la cepa de referencia como para estudiar los posibles variantes existentes en nuestras muestras. Snippy es capaz de encontrar SNPs entre un genoma de referencia y las secuencias que queremos estudiar. De este modo se detectaron tanto inserciones y deleciones como sustituciones nucleotídicas. Se aceptaron como variantes aquellos cambios nucleotídicos representados en el 75% de las lecturas que mapean en esa posición siempre y cuando existan al menos 4 lecturas para ella. Si no se cumplen estos criterios, el sistema coloca una N en esta posición. Finalmente, se unieron todas las secuencias mapeadas en un mismo fichero alineado con su correspondiente genoma de referencia utilizando snippy-core (156).

Adicionalmente, se utilizó el programa snp-dists (<https://github.com/tseemann/snp-dists>) para generar, a partir del alineamiento

obtenido con snippy-core, una matriz de distancias basada en los SNPs que se encuentra entre cada par de muestras de una misma especie.

3.18.4. Análisis filogenético

El alineamiento obtenido tras el mapeo contra el genoma de referencia fue utilizado para la reconstrucción filogenética de los aislados clínicos estudiados mediante el método de máxima verosimilitud en IQ-TREE (157). El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue GTR+I+G, en el que se asume que todas las bases nucleotídicas tienen la misma probabilidad de mutar y que las mutaciones son independientes entre ellas. Para mejorar la calidad de la inferencia se realizaron 10000 réplicas bootstrap. La visualización de los árboles filogenéticos se realizó utilizando la herramienta iTol (158).

3.18.5. Tipado molecular

El tipado molecular es un método bastante extendido en epidemiología molecular para identificar cepas de microorganismos en base a su material genético. Uno de los sistemas más utilizado es el Tipado Multilocus de Secuencia (MLST) que permite una caracterización taxonómica de las bacterias atendiendo a la secuencia de fragmentos internos de unos 450-500 pb, pertenecientes generalmente a 7 genes de mantenimiento también conocidos como house-keeping genes (genes de mantenimiento). Los alelos de cada gen tienen asignado un número en función del orden en el que han sido incorporados a las bases de datos. La combinación de los 7 alelos define el perfil alélico o secuenciotipo (ST) de esa bacteria.

A continuación, se indican los 7 genes utilizados para la determinación del ST en cada una de las especies:

- *Enterobacter hormaechei*: *dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*
- *Klebsiella oxytoca* y *K. pneumoniae*: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*

- *Escherichia coli*: *adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA*

En nuestro caso el tipado fue realizado utilizando ARIBA (159), una herramienta que permite la identificación de genes de resistencia a antibióticos como explicaremos a continuación, pero que también puede ser utilizada para la determinación del MLST de las bacterias usando la base de datos PubMLST.

En lugar del valor de ST podemos encontrar que el sistema devuelva otra información:

- ND: no existen datos suficientes para poder asignar un ST
- *: aparece un asterisco en caso de que el porcentaje de identidad del gen utilizado para el tipado sea inferior a 100, si existe más de un contig en el ensamblado o si se detectan SNPs heterocigotos.
- NOVEL: la combinación alélica encontrada no ha sido descrita anteriormente.

3.18.6. Análisis de genes de resistencia a antibióticos

Uno de nuestros objetivos en el estudio consiste en intentar explicar la aparición de nuevas resistencias en aislados clínicos de enterobacterias multirresistentes. En una primera aproximación utilizamos las secuencias filtradas para identificar los distintos genes de resistencia a antibióticos presentes en las muestras de interés mediante ARIBA (Antimicrobial Resistance Identification By Assembly,(159)).

ARIBA se diferencia de otras herramientas para la detección de determinantes antimicrobianos porque no requiere secuencias ensambladas, sino que trabaja directamente con las lecturas filtradas, lo que supone un ahorro computacional muy importante, reduciendo también la complejidad del proceso.

De forma resumida y tal y como se esquematiza en la figura M17, el funcionamiento de ARIBA consiste en comparar las lecturas de la muestra con secuencias de referencia para los genes de resistencia y sus variantes. En primer lugar, las secuencias de genes de resistencia de la base de datos se agrupan en clusters por

similitud utilizando CD-HIT (160). En segundo lugar, las secuencias de la muestra a analizar se mapean contra los grupos creados anteriormente usando minimap (161). Las lecturas que hayan mapeado contra cada grupo se ensamblan utilizando FERMI-lite (<https://github.com/lh3/fermi-lite>). La secuencia consenso resultante del paso anterior se compara con las secuencias de referencia contenidas en cada grupo para encontrar la secuencia más cercana. Para identificar y confirmar posibles variantes contra la secuencia de referencia, se utiliza el script NUCMER del paquete MUMmer (162). Finalmente, se genera un informe de las muestras que incluye, entre otras, la presencia de genes de resistencia a antibióticos y posibles variantes de estos que no estén recogidos en la base de datos.

En nuestro caso, las bases de datos utilizadas fueron MEGARes para los genes de resistencia y Plasmid Finder para la detección de los plásmidos que contienen los aislados.

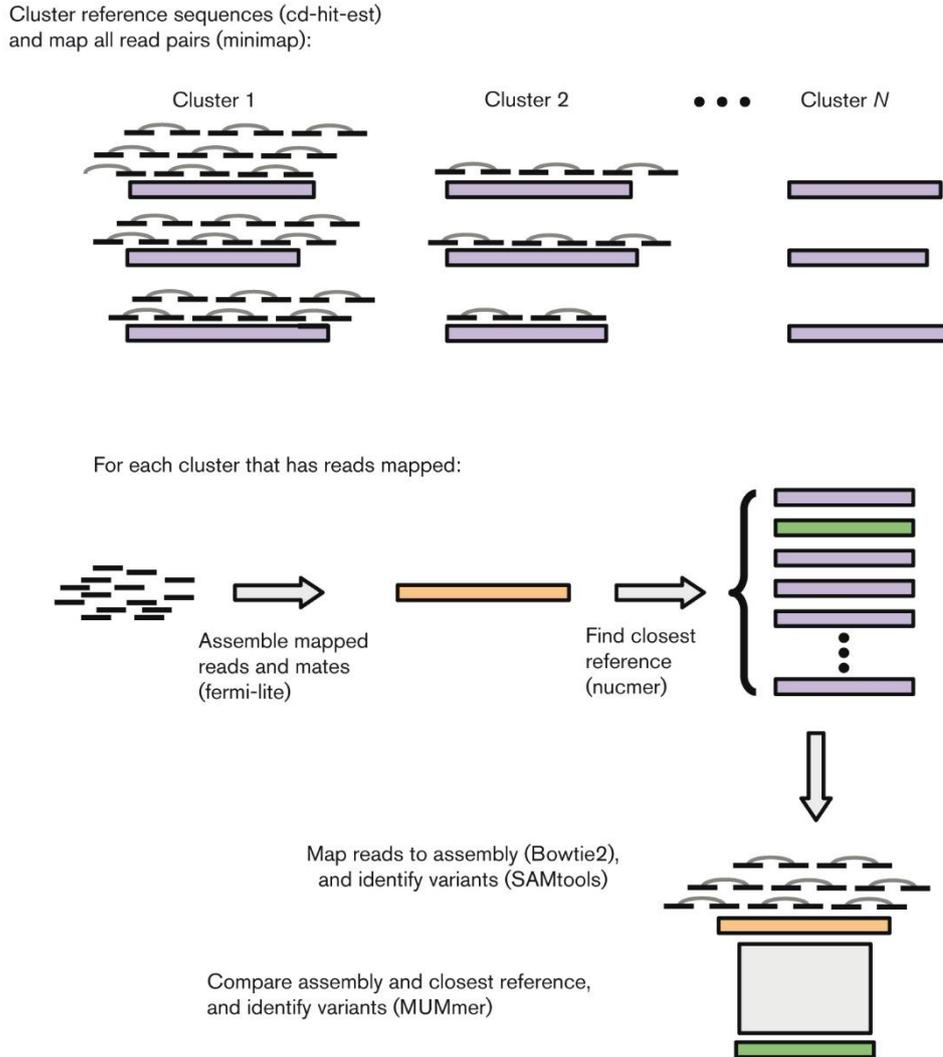


Figura M17. Visión general del proceso de mapeo y ensamblado de ARIBA. Los genomas de referencia se agrupan en clusters y se mapean contra ellos las lecturas a analizar. Las lecturas mapeadas se ensamblan y se busca la referencia más próxima. Se identifican las variantes comparando el ensamblado de las lecturas con la referencia. Figura tomada de Hunt et al., 2017.

3.18.7. Comparación de los aislados

Para cada pareja de muestras se comprobó la posible ganancia de material genético que pudiese evidenciar fenómenos de TGH independientemente de estar o no relacionados con la resistencia a antibióticos adquirida. Para ello se comparó el genoma ensamblado de ambos aislados de cada pareja mediante la herramienta BLAST

(163) implementada en el interior del programa BANDAGE de visualización de genomas ensamblados (164).

En el caso de encontrar alguna adquisición de material genético en el segundo aislado de la pareja, se determinó su función mediante la anotación asignada por Prokka. Además, para intentar localizar el material genético adquirido en la totalidad del genoma bacteriano (ubicación cromosómica, plasmídica, en un trasposón, etc.) se estudiaron los elementos del contig que acompañaban al gen adquirido.

Tabla M4. Listado de los cebadores utilizados en el estudio. Las secuencias subrayadas se corresponden con dianas para enzimas de restricción. Los nucleótidos en minúscula indican la secuencia del terminador del gen de fluorescencia.

Cebador	Secuencia	Objetivo	Molde
Construcción con el gen de fluorescencia <i>ytaA</i>			
EcFbFP-F7-Nc	CATGCCATGGCGTCGTTCCAGTC GTTC	Oligo directo para amplificar el gen <i>ytaA</i> añadiendo el sitio de corte <i>NcoI</i>	plásmido pGlow
EcFbFP-R8-H	CCCAGCTTTTACTCGAGCAGCTT TTCATATTC	Oligo reverso para amplificar el gen <i>ytaA</i> añadiendo el sitio de corte <i>HindIII</i>	plásmido pGlow
R388-F1-Bg	GGAAGATCTCGCAATGATTTCGA TGCGCC	Añade sitio de corte <i>BglII</i>	plásmido R388
R388-R2-Xb	TGCTCTAGACTGTGTGAAATTGTT ATCCGCTCACAATTGAATCTAAGT ATCATTGTTATCCGCTCACAAGTC AACACTCTTTTGGATAAATTTTCT CGAGTAAACACCGCCACGGAGC GG	Añade el sitio de corte <i>XbaI</i> , una de las secuencias flanqueantes para recombinar con plásmido R388 y el promotor Plac	plásmido R388
pET28-1-F	CAGGGCGCGTCCCATTGCGC	Añade un terminador al lado de <i>ytaA</i>	pET-32:: Plac::ytaA
R388-F2-E	CCGGAATTCGGGCCGCCCTCTC CCCCC	Añade sitio de restricción <i>EcoRI</i>	pET-32:: Plac::ytaA
KanR-1-F	GAATGGGACGCGCCCTGAAAG CCACGTTGTGTCTCAA	Amplifica gen de resistencia a kan y 20 nucleótidos solapantes con <i>ytaA</i> para poder hacer la fusión	pET-28a
KanR-2-R-B	CGCGGATCCAACCCGCCCTTTCCA TTGAGCAGGAAGGCCGAGATGC GGCCTTTTCTTTTGGACCTGGCGC GCTGAGGTCTGCCTCGTG	Amplifica el gen de resistencia a kan. Añade los 60nt flanqueantes para poder recombinar con el plásmido R388 y el sitio de restricción <i>BamHI</i>	pET-28a
R388-F3	GGGCCGCCCTCTCCCCC	Oligo directo que permite la fusión de Plac::ytaA con el gen de resistencia a kan (y las secuencias flanqueantes de ambos extremos). Elimina las dianas de restricción de los extremos	Amplificados previos solapantes que queremos fusionar

3. Material y Métodos

R388-R4	AACCCGCCCTTTCCATTGAGC	Oligo reverso que permite la fusión de Plac::ytvA con el gen de resistencia a kan (y las secuencias flanqueantes de ambos extremos). Elimina las dianas de restricción de los extremos	Amplificados previos solapantes que queremos fusionar
OCU108	CCGGGGGATCCTCTAGAGTCG	Amplifica el gen de resistencia a cm y añade sitio de restricción <i>Bam</i> HI	pZXL5
OCU109	CGGGGTACCCAAAAACCCCTC AAGACCCGTTTAGAGGCCCAA GGGGTTATGCTAGTTATAAAAG CCAGTCATTAGGCC	Amplifica el gen de resistencia a cm y añade sitio de restricción <i>Kpn</i> I	pZXL5
OCU110	CCGGAATTCATAAAAAAaccg ccgaagcgggtTTTTACGTTATTAC TCGAGCAGCTTTTCATATTC	Oligo reverso que amplifica el gen ytvA añadiéndole un terminador y un sitio de restricción <i>Eco</i> RI	pGLOW
OCU-112	TAATACCACTCCCTATCAGTGATA GAGAGGAGGAAGTGAAATGGCG TCGTTCCAGTCGTTCCG	Oligo directo que amplifica el gen ytvA añadiéndole la 1ª parte de Ptet	pGLOW
OCU-113	CGGGGTACCTTTTTGTTGACTC TATCATTGATAGAGTTATAATACC ACTCCCTATCAGTGATAG	Oligo directo que amplifica el gen ytvA añadiéndole la 2ª parte de Ptet y diana de restricción para <i>Kpn</i> I	PCR1 Ptet-ytvA
OCU-114	TATTTAAATAATATCGTTAGTCGA CTAAGGAGGTGAAAAGTATGGC GTCGTTCCAGTCGTTCCG	Oligo directo que amplifica el gen ytvA añadiéndole la 1ª parte de Pro	pGLOW
OCU-115	TTATAGCAATGATCATTTTTCGAC AACTGTATAACGAGATTATTTAA ATAATATCGTTAGTCGAC	Oligo directo que amplifica el gen ytvA añadiéndole la 2ª parte de Pro	PCR1 Pro-ytvA
OCU-116	CGGGGTACCCTAGTAAAAAGCTG TTGACATATTGCTCTAATAAATTT ATTATAGCAATGATCATTTTTCGA C	Oligo directo que amplifica el gen ytvA añadiéndole la 3ª parte de Pro y diana de restricción para <i>Kpn</i> I	PCR2 Pro-ytvA
OCU-117	GCAATTTTCGTA CTGAAACATCTT AATCATGCTAAGGAGGTTTTCTA ATGGCGTCGTTCCAGTCGTTCCG	Oligo directo que amplifica el gen ytvA añadiéndole la 1ª parte de Ptet2	pGLOW

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

OCU-118	GAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAA GGAGATCAACAATGAAAGCAATT TTCGTAAGTAAACATCTTA	Oligo directo que amplifica el gen <i>ytaA</i> añadiéndole la 2ª parte de P _{tet2}	PCR1 P _{tet2} - <i>ytaA</i>
OCU-119	CGGGGTACCTTGACATCCCTATC AGTGATAGATAGTATGTGTGGAG GGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGG	Oligo directo que amplifica el gen <i>ytaA</i> añadiéndole la 3ª parte de P _{tet2} y diana de restricción para <i>KpnI</i>	PCR2 P _{tet2} - <i>ytaA</i>
OCU-145	TTCCGGGGTACCTTGACATCCCTA TC	Oligo directo que amplifica el gen de fluorescencia con el promotor P _{tet2} añadiendo 6 nucleótidos extra al lado de la diana de <i>KpnI</i> para facilitar la digestión.	PCR3 P _{tet2} - <i>ytaA</i>
OCU-146	CCACCACCGGAATTCATAAAAA AACC	Oligo reverso para añadir 9 nucleótidos extra al lado de la diana <i>EcoRI</i> de la construcción P _{tet2} :: <i>ytaA</i> (o <i>sfgfp</i>) para facilitar la digestión	PCR3 P _{tet2} - <i>ytaA</i>
OCU-139	GGGCCGCCCTCTCCCCCTCACC CTCCCCGGCCTCGATGCCGCTCC GTGGCGGTGTTAAGGTCGACTC TAGAGGATCC	Oligo directo que añade 60nt flanqueantes para la recombinación con el plásmido R388	Construcción pcN47:: <i>cat</i> ::promotor :: <i>ytaA</i>
OCU-140	AACCCGCCCTTTCCATTGAGCAG GAAGGCCGCAGATGCGGCCTTTT CTTTTGGACCTGGCTGTCACTTTG CTTGATATATGAG	Oligo reverso que añade 60nt flanqueantes para la recombinación con el plásmido R388	Construcción pcN47:: <i>cat</i> ::promotor :: <i>ytaA</i>
OCU-141	CGCGTATAGCTTGCCGGAAGTCG CCTTGACCCGCATGGCATAGGCC TATCGTTTCCACGAAGGTCGACT CTAGAGGATCC	Oligo directo que añade 60nt flanqueantes para la recombinación con el plásmido RP4	Construcción pcN4:: <i>cat</i> ::promotor :: <i>ytaA</i>
OCU-142	GTCTGACGCGGTGGAAAGGGGG AGGGGATGTTGTCTACATGGCTC TGCTGTAGTGAGTGGTGTCACTT TGCTTGATATATGAG	Oligo reverso que añade 60nt flanqueantes para la recombinación con el plásmido RP4	Construcción pcN4:: <i>cat</i> ::promotor :: <i>ytaA</i>
Construcción con el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i>			
OCU-148	TAATACCACTCCCTATCAGTGATA GAGAGGAGGAAGTGAATGGTG AGCAAGGGCGAGGAGC	Oligo directo que amplifica el gen <i>sfgfp</i> añadiéndole la 1ª parte de P _{tet}	pET- <i>sfgfp</i>

OCU-149	GCAATTTTCGTA CTGAAACATCTT AATCATGCTAAGGAGGTTTCTA ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	Oligo directo que amplifica el gen <i>sfgfp</i> añadiéndole la 1ª parte de P _{tet2}	pET- <i>sfgfp</i>
OCU-150	CCGGAATTCATAAAAAAaccgc cgaagcgggtTTTTACGTTATTACTT GTACAGCTCGTCCATGCC	Oligo reverso utilizado para amplificar el gen <i>sfgfp</i> , añadiéndole un terminador y la diana de restricción para <i>EcoRI</i>	pET- <i>sfgfp</i>
OCU-270	TTCCGGGGTACCCTGTGCAGGTC GTAAATCACTGCATAATTCCG	Oligo directo para amplificar el promotor Plac del grupo del Dr. Sorensen. Añade sitio de restricción <i>KpnI</i>	DH5α/ RP4:: Plac::GFPm3
OCU-271	CCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCC TTGCTCACCATATGTAAATCCTCC TTATTAGGCTGTGTG	Oligo reverso para amplificar el promotor Plac del grupo del Dr. Sorensen. Añade cola para PCR Fusión con <i>sfgfp</i>	DH5α/ RP4:: Plac::GFPm3
OCU-272	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC TGTTACCGGGGT	Oligo directo para la amplificación del gen <i>sfgfp</i>	pET- <i>sfgfp</i>
Secuenciación del gen 16S rRNA con Illumina			
Uni341F	CCTAYGGGRBGCASCAG	Oligo directo usado para la secuenciación las bacterias aisladas por citometría de flujo	
Uni806R	GGACTACNNGGGTATCTAAT	Oligo reverso usado para la secuenciación de las bacterias aisladas por citometría de flujo	
16S-F	CCTACGGGNGGCWGCAG	Oligo directo usado para la secuenciación en el estudio del efecto de la dieta en la microbiota intestinal	
16F-R	GACTACHVGGGTATCTAATCC	Oligo reverso usado para la secuenciación en el estudio del efecto de la dieta en la microbiota intestinal	

Tabla M5. Listado de cepas utilizadas en el estudio

<i>Escherichia coli</i>			
Cepa	Nombre usado en este trabajo	Descripción	Referencia
BL21-DE3	BL21-DE3	Posee el enzima RNA polimerasa T7 inducible por IPTG	Colección europea tipo DSMZ
CU125	BL21-DE3/ pGLOW	BL21-DE3 con el plásmido comercial pGLOW-KXN-Bs2 (evoglow [®]). Plásmido usado como molde para amplificar el gen <i>ytvA</i>	Este estudio
DSM 6897	DH5α	Cepa de laboratorio	Colección europea tipo DSMZ
DH5α / pET-32	DH5α / pET-32	Cepa de <i>E. coli</i> con el plásmido pET-32 (plásmido lanzadera para clonaciones)	Novagen
CU127	DH5α / pET-32:: <i>ytvA</i>	DH5α que contiene el plásmido pET-32 con el gen <i>ytvA</i>	Este estudio
CU129	DH5α / pET-32:: <i>Plac</i> :: <i>ytvA</i>	DH5α que contiene plásmido pET-32 con el gen <i>ytvA</i> bajo la regulación del promotor PA1/03/04 (<i>Plac</i>) y el fragmento flanqueante izquierdo	Este estudio
CU133	DH5α / pET-32:: <i>Plac</i> :: <i>ytvA</i> :: <i>kan</i>	DH5α que contiene el plásmido pET-32 con el gen <i>ytvA</i> bajo la acción del promotor PA1/03/04 (<i>Plac</i>), el gen de resistencia a kanamicina, y los fragmentos flanqueantes de ambos extremos	Este estudio
CU9	DH5α:: <i>cat</i>	DH5α que contiene en su genoma un gen de resistencia a cloranfenicol	Cepa de nuestro laboratorio
CU193	DH5α <i>stp</i> ^R	DH5α mutante natural a estreptomina	Este estudio
DSM-5189	<i>E. coli</i> /R388	<i>E. coli</i> que contiene el plásmido conjugativo R388	Colección europea tipo DSMZ
DH5α /pKD46-Gm	DH5α /pKD46-Gm	DH5α que contiene el plásmido pKD46-Gm (plásmido termosensible, resistente a gentamicina que codifica para recombinasa Red del fago λ	(130)
CU200	DH5α /pKD46-Gm/ R388	DH5α que contiene los plásmidos R388 y pKD46-Gm	Este estudio

3. Material y Métodos

CU188	DH5α::cat / R388::Plac::ytvA::kan	DH5α que contiene la construcción fluorescente con el gen <i>ytvA</i> , el promotor Plac y el gen de resistencia a kan en el interior del plásmido conjugativo R388	Este estudio
CU554	DH5α / pCN47::cat	DH5α que contiene el gen de resistencia a cm (<i>cat</i>) en el interior del plásmido lanzadera pCN47	Este estudio
CU555	DH5α/ pCN47::cat::Ptet::ytvA	DH5α que contiene el gen <i>ytvA</i> bajo la acción del promotor Ptet y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido lanzadera pCN47	Este estudio
CU564	DH5α/ pCN47::cat::Ptet2::ytvA	DH5α que contiene el gen de <i>ytvA</i> bajo la acción del promotor Ptet2 y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido lanzadera pCN47	Este estudio
CU556	DH5α/ pCN47::cat::Pro::ytvA	DH5α que contiene el gen <i>ytvA</i> bajo la acción del promotor Pro y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido lanzadera pCN47	Este estudio
DSM 3876	K12 J53 /RP4	Cepa <i>E. coli</i> K12 que contiene el plásmido conjugativo RP4	Colección europea tipo DSMZ.
CU552	DH5α/ pKD46-Gm/RP4	DH5α que contiene los plásmidos RP4 y pKD46-Gm	Este estudio
CU567	DH5α/ R388::cat::Ptet::ytvA	DH5α que contiene el gen <i>ytvA</i> bajo la acción del promotor Ptet y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo R388	Este estudio
CU569	DH5α/ R388::cat::Ptet2::ytvA	DH5α que contiene el gen <i>ytvA</i> bajo la acción del promotor Ptet2 y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo R388	Este estudio
CU568	DH5α/ RP4::cat::Ptet::ytvA	DH5α que contiene el gen <i>ytvA</i> bajo la acción del promotor Ptet y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo RP4	Este estudio

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

CU570	DH5α/ RP4::cat::Ptet2::ytvA	DH5α que contiene el gen <i>ytvA</i> bajo la acción del promotor Ptet2 y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo RP4	Este estudio
MG1655	MG1655/ RP4::Plac::GFPm3	Usada como molde para amplificar promotor Plac	Cedida por el laboratorio de S. J. Sorensen (6)
DH5α/ pET-sfgfp	DH5α/ pET-sfgfp	Usada como molde para amplificar el gen <i>sfgfp</i>	Addgene
CU575	DH5α/ pCN47::cat::Ptet::sfgfp	DH5α que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido lanzadera pCN47	Este estudio
CU577	DH5α/ pCN47::cat::Ptet2::sfgfp	DH5α que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet2 y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido lanzadera pCN47	Este estudio
CU750	DH5α/ pCN47::cat::Plac::sfgfp	DH5α que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Plac y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido lanzadera pCN47	Este estudio
CU581	DH5α/RP4::cat::Ptet::sfgfp	DH5α que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo RP4	Este estudio
CU582	DH5α/RP4::cat::Ptet2::sfgfp	DH5α que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet2 y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo RP4	Este estudio
CU752	DH5α/RP4::cat::Plac::sfgfp	DH5α que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Plac y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo RP4	Este estudio

3. Material y Métodos

CU579	DH5α/R388::cat::Ptet::sfgfp	DH5α que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo R388	Este estudio
CU580	DH5α/R388::cat::Ptet2::sfgfp	DH5α que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet2 y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo R388	Este estudio
CU571	DH5α/R388::cat::Plac::sfgfp	DH5α que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Plac y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo R388	Este estudio
DH5αZ1	DH5αZ1	Contiene insertados en su cromosoma los represores de los promotores Ptet y Plac, además de un gen de resistencia a espectinomicina.	Expressys
CU585	DH5αZ1/RP4::cat::Ptet::sfgfp	DH5αZ1 que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo RP4. La cepa contiene un represor en su genoma para este promotor.	Este estudio
CU586	DH5αZ1/RP4::cat::Ptet2::sfgfp	DH5αZ1 que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet2 y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo RP4. La cepa contiene un represor en su genoma para este promotor.	Este estudio
CU754	DH5αZ1/RP4::cat::Plac::sfgfp	DH5αZ1 que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Plac y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo RP4. La cepa contiene un represor en su genoma para este promotor.	Este estudio

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

CU583	DH5αZ1/R388::cat::Ptet::sfgfp	DH5αZ1 que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo R388. La cepa contiene un represor en su genoma para este promotor.	Este estudio
CU584	DH5αZ1/R388::cat::Ptet2::sfgfp	DH5αZ1 que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet2 y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo R388. La cepa contiene un represor en su genoma para este promotor.	Este estudio
CU753	DH5αZ1/R388::cat::Plac::sfgfp	DH5αZ1 que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Plac y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo R388. La cepa contiene un represor en su genoma para este promotor.	Este estudio
CU719	DH5αZ1 stp^R	DH5αZ1 resistente a stp (1mg/ml) obtenida mediante mutagénesis natural	Este estudio
CU720	DH5αZ1 stp^R/RP4::cat::Ptet::sfgfp	DH5αZ1 resistente a stp que contiene el gen de fluorescencia <i>sfgfp</i> bajo la acción del promotor Ptet y el gen de resistencia a antibiótico (<i>cat</i>) en el interior del plásmido conjugativo RP4. La cepa contiene en su genoma un represor para este promotor	Este estudio

Aislados clínicos de enterobacterias multirresistentes

Cepa	Nombre usado en este trabajo	Descripción	Referencia
235	235	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Este estudio
257	257	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Este estudio
1583	1583	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Este estudio
1623	1623	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Este estudio
1625	1625	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Este estudio
1659	1659	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Este estudio
237	237	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Este estudio
246	246	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Este estudio

3. Material y Métodos

357	357	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Este estudio
430	430	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Este estudio
1007	1007	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Este estudio
1029	1029	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Este estudio
132	132	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
135	135	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
779	779	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
776	776	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
806	806	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
861	861	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
1410	1410	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
1452	1452	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
1446	1446	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
1482	1482	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
1636	1636	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
1572	1572	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
2164	2164	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
2169	2169	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este estudio
77	77	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
108	108	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
470	470	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
505	505	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
148	148	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
188	188	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
1009	1009	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
1053	1053	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
1768	1768	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
1816	1816	<i>Escherichia coli</i>	Este estudio
Otras bacterias usadas en este trabajo			
Cepa	Nombre usado en este trabajo	Descripción	Referencia
<i>Enterococcus faecium</i> Aus0004	<i>Enterococcus faecium</i> Aus0004 (VRE)	Aislado clínico de infección sanguínea. Australia, 1998	(165)

4. Resultados

4.1. Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

4.1.1. Elaboración de las construcciones necesarias para el estudio de diseminación de EGM en la microbiota intestinal

4.1.1.1. Utilización de la proteína fluorescente FbFP con el fin de detectar diseminación de EGM en el ambiente anaeróbico intestinal.

La transferencia genética horizontal (TGH) de elementos genéticos móviles (EGM), tales como plásmidos conjugativos, juega un papel crucial en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (166).

Con el objetivo de estudiar TGH en el ambiente intestinal seguimos una estrategia de detección mediante citometría de flujo de plásmidos conjugativos naturales, que contienen resistencia a múltiples antibióticos, mediante la inserción en el plásmido de un marcador fluorescente. En esta estrategia la célula donadora contiene, por un lado el plásmido conjugativo con el marcador fluorescente controlado por un promotor de amplio espectro y, por otro lado, un represor en el cromosoma que inhibe la expresión del gen. Esto quiere decir que cuando visualicemos las células por citometría de flujo, no detectaremos fluorescencia para las células donadoras, debido a la acción del represor; sin embargo, sí que serán fluorescentes aquellas células a las que se haya podido transferir el plásmido por conjugación.

El ambiente anaeróbico o microaerófilo del intestino no permite la utilización de las proteínas del tipo Green Fluorescent proteins (GFP), típicamente usadas como reporteros fluorescentes. Esto es debido a que este tipo de proteínas requieren oxígeno para su correcto plegamiento y fluorescencia. Por este motivo, en primer lugar, decidimos utilizar como reporteros las proteínas fluorescentes de unión a flavina tolerante a la hipoxia (FbFP) que han sido anteriormente utilizadas para la visualización de fluorescencia en bacterias estrictamente anaerobias (167).

El objetivo inicial de este proyecto consistía en conseguir una construcción plasmídica que expresara proteínas fluorescentes en condiciones anaeróbicas bajo la

acción de un promotor de amplio espectro, que pudiese funcionar en el mayor número posible de bacterias diferentes. Posteriormente, la construcción obtenida en un vector lanzadera sería integrada en plásmidos conjugativos con el fin de detectar por citometría de flujo aquellas bacterias de la microbiota intestinal que adquirieron el plásmido conjugativo (bacterias fluorescentes). Para ello se fueron realizando diversas clonaciones intermedias que se describen a continuación con el gen *ytvA* (codifica para FbFP) en las que se comprobó mediante citometría de flujo el correcto funcionamiento de las construcciones obtenidas.

En primer lugar, el plásmido comercial pGLOW que contiene el gen *ytvA* fue transformado en la cepa *E.coli* BL21-DE3, generando la cepa BL21-DE3/pGLOW (CU125), con el objetivo de comprobar mediante citometría de flujo (metodología, apartado 3.14) la fluorescencia emitida por bacterias que presentaran el plásmido. La expresión del gen *ytvA* en el plásmido pGLOW está controlada por el promotor T7 (PT7), un promotor inducible con el compuesto isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), por lo que el análisis de la fluorescencia por citometría de flujo se realizó creciendo la bacterias e induciendo el promotor añadiendo IPTG en el medio de cultivo. Los resultados de citometría confirman que somos capaces de detectar la fluorescencia emitida por la proteína FbFP (Figura R1). Más aun, el porcentaje de células fluorescentes aumentó considerablemente (de 47.9% a 86.3%) cuando la cepa se creció en presencia del inductor IPTG (Figura R1B-C).

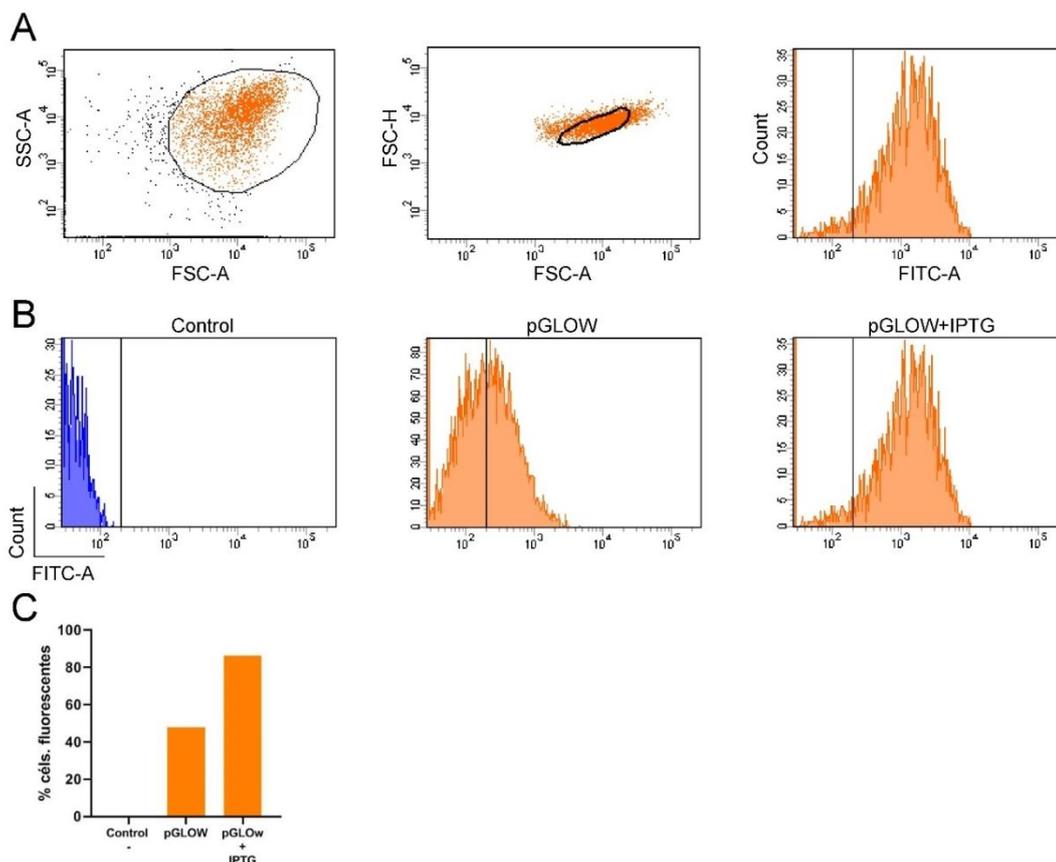


Figura R1. Fluorescencia emitida por la cepa que contiene el plásmido comercial pGLOW. (A) Esquema general de citometría utilizado para testar todas las construcciones en cultivos puros. En primer lugar se seleccionan los eventos detectados según las características de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) que esperamos para nuestras células. A continuación, se eliminan los agregados enfrentando en un gráfico área (FSC-A) y altura (FSC-H); se consideran “singletes” (células individuales) aquellos que cumplen una proporción 1:1 entre el área y altura de la señal fluorescente. Por último, se observan las bacterias en el canal FITC-A ($\lambda = 530 \pm 30$ nm) para el que esperamos ver la señal fluorescente. **(B)** Representación en histograma del número de bacterias fluorescentes identificadas de un cultivo puro de la cepa *E. coli* BL21-DE3 conteniendo el plásmido pGLOW. La fluorescencia se midió a partir de un cultivo donde se indujo la síntesis de la proteína FbFP mediante IPTG 1mM (pGLOW + IPTG). Como controles se utilizó la misma cepa sin inducir (pGLOW) y la cepa sin plásmido (Control). **(C)** Representación en gráfico de barras del porcentaje de células fluorescentes para las mismas cepas y condiciones que el apartado B.

Una vez testada la fluorescencia del plásmido comercial, comenzamos nuestra estrategia para introducir el gen que codifica la proteína fluorescente en un plásmido conjugativo con alto espectro de disseminación. Nuestra construcción inicial se componía de: el gen *ytvA* bajo la acción del promotor sintético PA1/04/03 (nos referiremos a él en el texto como Plac) modificado para poder aumentar la expresión del gen al que precede y un gen de resistencia a un antibiótico como marcador de

selección (AB). La construcción se encuentra flanqueada por 60 nt homólogos al punto donde será insertada dentro del plásmido conjugativo (métodos, Figura M6). El plásmido originalmente seleccionado para hacer el estudio de diseminación fue el plásmido conjugativo R388, un plásmido perteneciente a la familia IncW, que confiere resistencia a diversos antibióticos (i.e. sulfonamidas y trimetoprim) y un amplio espectro de diseminación bacteriana (168).

En un primer paso introdujimos el gen *ytvA* y el promotor Plac en el interior del plásmido lanzadera pET-32 y comprobamos por citometría que, aunque existe una ligera disminución con respecto a la fluorescencia observada con el plásmido comercial pGLOW, seguimos siendo capaces de detectar la señal fluorescente en el 69,5% de células. (Figura R2A-B). A continuación, la construcción fue introducida por recombinación homóloga (métodos, Figura M7) en el plásmido conjugativo R388, detectándose por citometría una disminución del número de células fluorescentes casi del 50% con respecto al plásmido lanzadera (Figura R2D). Esta disminución podría deberse al menor número de copias del plásmido conjugativo con respecto al lanzadera.

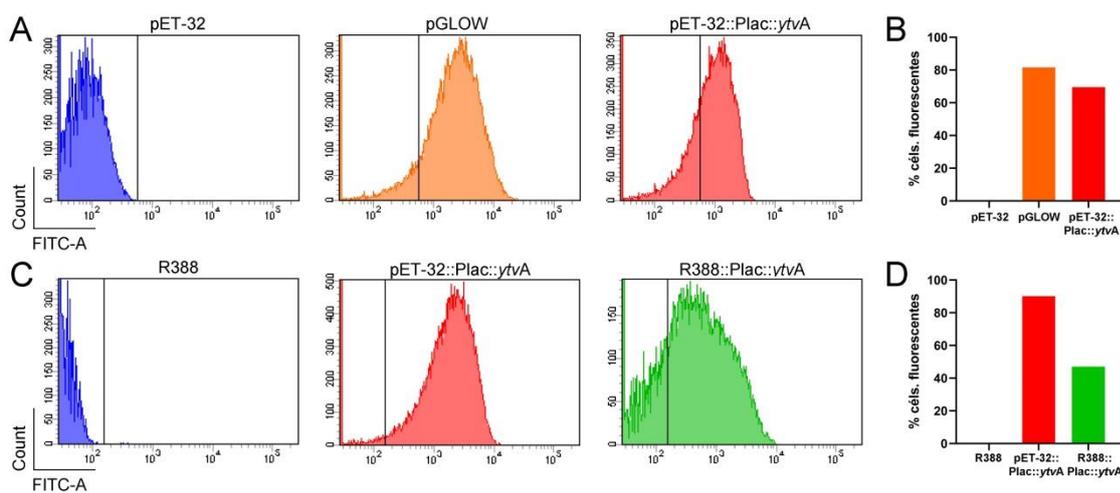


Figura R2. Resultados de fluorescencia en citometría para la construcción de *ytvA* en aerobiosis. (A) Representación en histograma de los eventos fluorescentes (medidos en el canal FITC-A del citómetro) de la construcción Plac::*ytvA* en el interior del plásmido lanzadera pET-32 en comparación con el control negativo (pET-32) y el control positivo (pGLOW), ambos inducidos con IPTG. **(B)** Representación en gráfico de barras del porcentaje de células fluorescentes para las 3 muestras descritas en (A). **(C)** Representación en histograma de los eventos fluorescentes en la construcción Plac::*ytvA* en el interior del plásmido conjugativo R388 en comparación con el control negativo (R388) y el control positivo (pET-32::Plac::*ytvA*).

(D) Representación en gráfico de barras del porcentaje de células fluorescentes para las 3 muestras descritas en (C).

Todas las pruebas de fluorescencia realizadas hasta el momento fueron hechas, por facilitar el manejo de las mismas, en aerobiosis, pero dado que nuestro objetivo es el estudio de la transferencia de EGM en el ambiente anaeróbico intestinal, testamos también la fluorescencia emitida en anaerobiosis por la cepa de *E. coli* (CU188), que contiene el plásmido conjugativo con la construcción Plac::*ytvA*. Como se puede observar en la Figura R3, el % de células fluorescentes disminuyó aproximadamente a la mitad en condiciones de anaerobiosis. Más aun, hasta ahora habíamos utilizado como control no fluorescente la bacteria que contenía el plásmido conjugativo sin la construcción que expresa fluorescencia. En este experimento, además, añadimos otro control: una muestra de heces de ratón. Dicha muestra contiene las bacterias de la microbiota intestinal (bacterias aceptoras en los posibles experimentos de conjugación que pensábamos realizar con el plásmido que contenía construcción Plac::*ytvA*). Cabe destacar que las heces presentan cierto grado de fluorescencia basal. Por tanto, para poder diferenciar células que adquirieran el plásmido con la construcción Plac::*ytvA* del resto de células de la microbiota, debíamos subir el umbral de lo que consideramos una célula fluorescente. Al subir el umbral, el número de células fluorescentes debido a la presencia del plásmido R388 Plac::*ytvA* en condiciones de anaerobiosis se redujo drásticamente (Figura R3). Como se aprecia en dicha figura, tan solo un 2% de las células que contenían el plásmido R388 Plac::*ytvA* eran más fluorescentes que las heces.

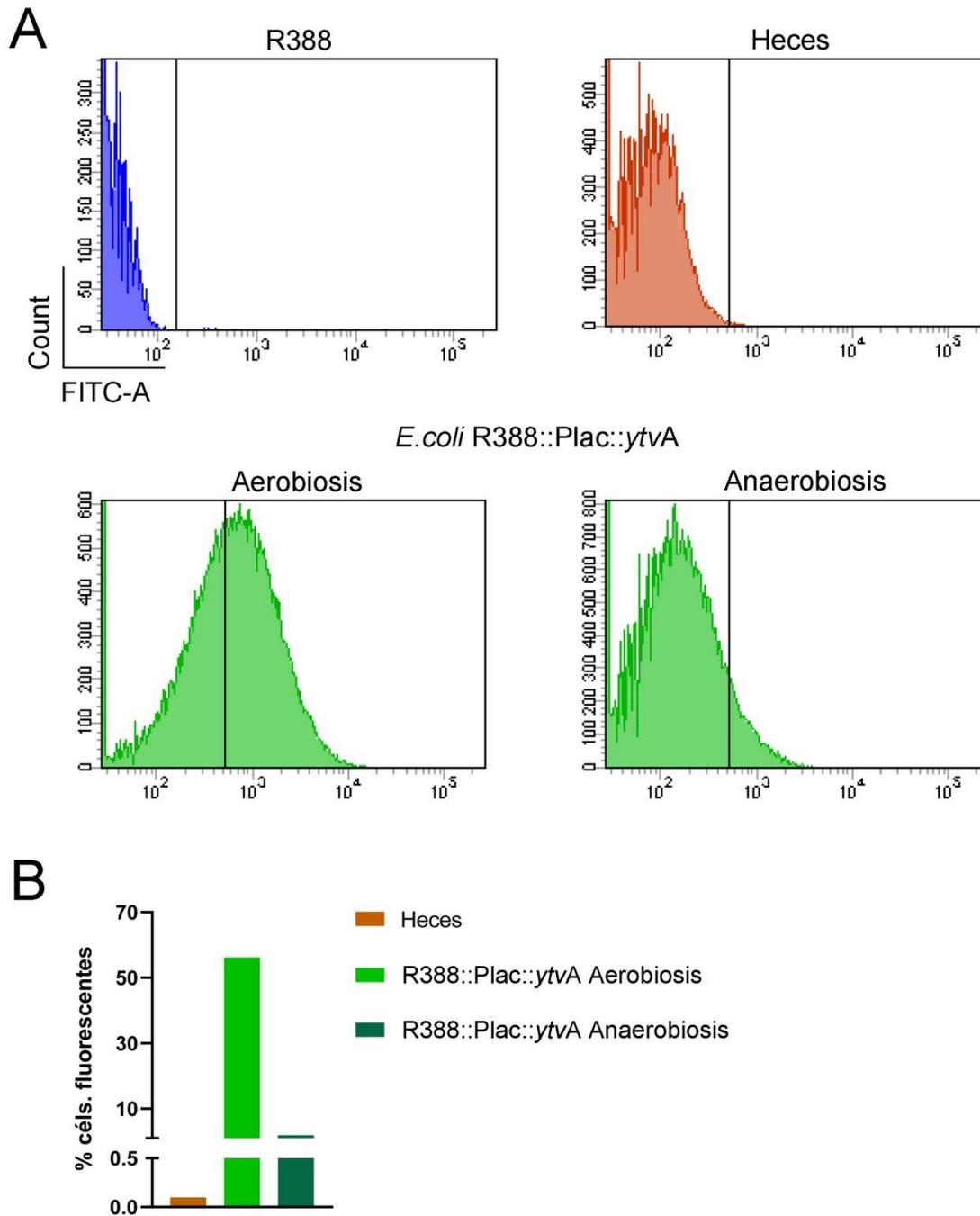


Figura R3. La fluorescencia emitida por la cepa de *E. coli* que contiene el plásmido conjugativo R388 con la construcción Plac::ytvA desciende en condiciones anaeróbicas. **(A)** Representación en histograma de los eventos fluorescentes de bacterias *E. coli* DH5 α que contiene el plásmido conjugativo R388 con la construcción Plac::ytvA crecidas en aerobiosis o anaerobiosis. Como control usamos la cepa con el plásmido R388 sin modificar (R388) y heces de ratón (Heces). **(B)** Representación en gráfico de barras del porcentaje de células fluorescentes para las heces y los plásmidos conteniendo la construcción R388::ytvA en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis.

El hecho de que observáramos una reducción de la fluorescencia en condiciones de anaerobiosis fue sorprendente teniendo en cuenta que la proteína FbFP emite la misma fluorescencia en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Con el fin de confirmar este resultado ya publicado, y discernir si la menor fluorescencia detectada era debido a la construcción realizada (ej. menor expresión en anaerobiosis con el promotor elegido), crecimos en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis una cepa que contenía el plásmido original pGLOW. Como se observa en la Figura R4, el % de células fluorescentes de la cepa que contiene el plásmido pGLOW es similar tanto en condiciones de aerobiosis como anaerobiosis. Con este resultado descartamos que la menor fluorescencia en anaerobiosis fuera debida a la proteína FbFP y confirmamos los resultados ya publicados. Este resultado inesperado de una menor fluorescencia fue observado también con la construcción Plac::ytvA clonada en el plásmido multicopia lanzadera pET-32, similar en cuanto a número de copias al pGLOW (resultado no mostrado). Estos resultados sugieren que la disminución en la fluorescencia observada en anaerobiosis probablemente se deba al promotor que controla la expresión del gen *ytvA*. En el caso del plásmido pGLOW, el gen *ytvA* se encuentra regulado por el promotor PT7, mientras que tanto en el plásmido pET-32 como R388 se encontraba bajo la regulación del promotor PA1/04/03. Por tanto, por algún motivo que desconocemos, el promotor PA1/04/03 elegido no funcionaba correctamente en anaerobiosis.

Por ello, se decidió buscar nuevos promotores que pudiesen aumentar la expresión del gen *ytvA* y que, según la literatura, podrían funcionar correctamente en diversos tipos de bacterias, incluyendo Gram positivas y Gram negativas. Además, elegimos promotores para los cuales existiera un represor capaz de inhibir su expresión en la célula donadora, de manera que la fluorescencia solo se detectara en la célula transconjugante (TC). El promotor PT7 del plásmido pGLOW no cumplía estos requisitos, pues no está descrita su utilización para ser expresado en un amplio rango de bacterias además de no tratarse de un promotor reprimible por un represor constitutivo, por lo que no era apto para nuestro estudio.

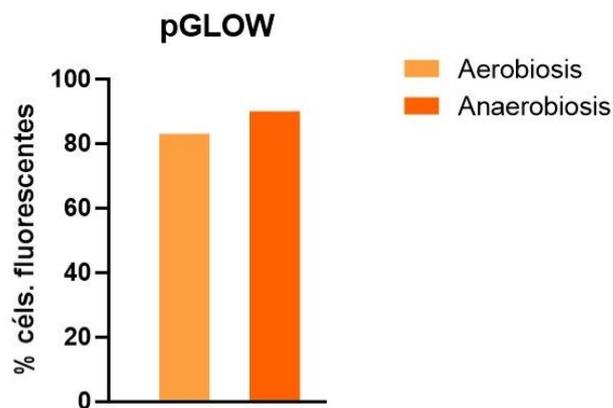


Figura R4. La fluorescencia emitida por la cepa de *E. coli* que contiene el plásmido pGLOW es similar en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Representación en gráfico de barras del porcentaje de células (céls.) fluorescentes para las bacterias *E. coli* que contienen el plásmido pGLOW con la construcción PT7::ytvA inducidos con IPTG en aerobiosis o anaerobiosis.

Cambiando ligeramente el orden de los genes en la construcción y la estrategia de clonaje (métodos, figura M8 y M9) se introdujo el gen *ytvA* en el plásmido lanzadera pCN47 bajo la acción de distintos promotores: el promotor del gen de tetraciclina (Ptet), un promotor derivado de Ptet (Ptet2) que incrementa la expresión del gen asociado, al menos en *E. coli* (142) y el promotor Pro del fago P1. El cambio de plásmido lanzadera se debe a la existencia, en el plásmido pCN47, de un sitio de clonación múltiple más apropiado para la nueva construcción diseñada. En este caso decidimos introducir las construcciones obtenidas en el plásmido RP4 además del plásmido R388. El plásmido conjugativo RP4 pertenece a la familia de plásmidos IncP y, al igual que R388, es un plásmido con resistencia natural a diversos antibióticos (i.e. tetraciclina, ampicilina y kanamicina) y un amplio espectro de diseminación. De esta manera, usando los dos plásmidos, podríamos estudiar posibles diferencias en la transferencia de dichos plásmidos hacia distintas bacterias receptoras.

Como podemos observar en la Figura R5, el nivel de fluorescencia de las construcciones con los diferentes promotores testadas en el plásmido lanzadera alcanzan niveles de fluorescencia en condiciones anaeróbicas que nos permiten discriminar las bacterias que contiene la construcción de la autofluorescencia emitida por las heces (Figura R5A). De los tres promotores testados, Pro es el que proporciona una menor fluorescencia por lo que se decidió continuar únicamente con los otros dos promotores. Seguidamente, transferimos la construcción desde el plásmido lanzadera

a los plásmidos conjugativos R388 y RP4, utilizando nuevamente la técnica de recombinación homóloga (métodos, apartado 3.9.1.). Posteriormente testamos la fluorescencia emitida por las cepas obtenidas. Desafortunadamente, la fluorescencia emitida por las construcciones integradas en los plásmidos conjugativos en condiciones anaeróbicas no era suficiente para poder distinguirla de la autofluorescencia en heces (Figura R5B). De hecho solo un porcentaje muy pequeño presentaba una mayor fluorescencia que las bacterias de las heces (Figura R5B).

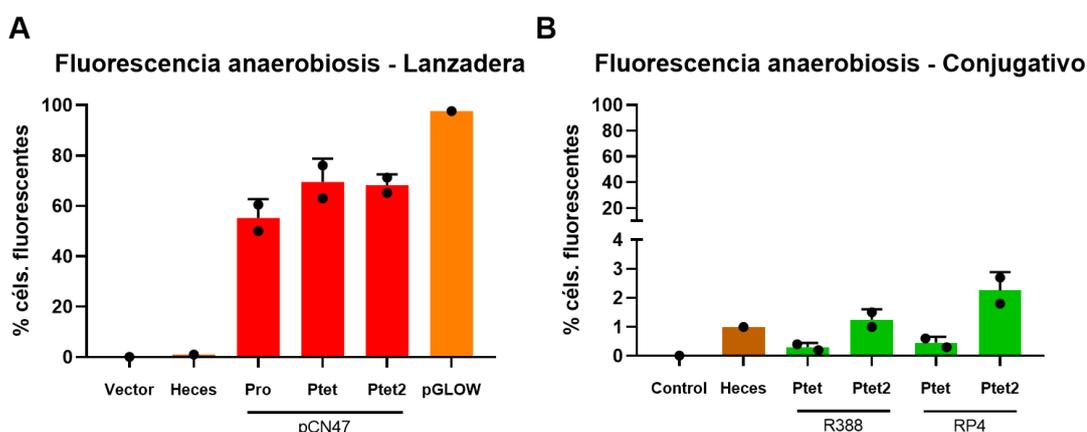


Figura R5. Fluorescencia en anaerobiosis emitida por distintas construcciones que presentan el gen *ytvA* bajo el control de distintos promotores. (A) Diagrama de barras que representa el porcentaje de células (céls.) fluorescentes detectado por citometría de flujo de las cepas que contienen el gen *ytvA* bajo el control de diferentes promotores (Pro, Ptet y Ptet2) en el plásmido lanzadera pCN47. Como controles negativos se utilizó el vector sin el gen *ytvA* y heces de ratones. Como control positivo se utilizó el plásmido pGLOW inducido con IPTG. **(B)** Porcentaje de células fluorescentes de las construcciones Ptet::*ytvA* y Ptet2::*ytvA* introducidas en los plásmidos conjugativos R388 y RP4. Se descartó el promotor Pro por ser el que menor fluorescencia proporcionaba en el plásmido lanzadera. Como controles negativos en este caso se utilizaron bacterias con el plásmido R388 sin la construcción fluorescente y heces de ratón. En ambas figuras, la barra representa la media y las líneas verticales la desviación típica.

4.1.1.2. Utilización de la proteína fluorescente sfGFP con el fin de detectar diseminación de EGM en el ambiente anaeróbico intestinal

La reciente publicación de una proteína GFP modificada (superfolder GFP, sfGFP) que había sido utilizada con éxito para detectar bacterias anaeróbicas mediante fluorescencia (8), sumado a los problemas existentes para diferenciar nuestras bacterias fluorescentes de la microbiota intestinal usando la proteína FbFP, hizo que

modificáramos la estrategia inicialmente planteada en nuestro proyecto. En esta nueva estrategia, decidimos generar una construcción que expresara la proteína fluorescente sfGFP (métodos, Figura M10). Esta variante de la proteína GFP requiere únicamente una breve exposición al oxígeno para plegarse de manera correcta y poder emitir fluorescencia. Esto nos permite realizar los experimentos en condiciones anaeróbicas que permitirían el crecimiento de las bacterias intestinales. Posteriormente se incubarían las bacterias a 4°C en presencia de oxígeno para obtener la señal fluorescente antes de visualizarlas en el citómetro de flujo. Por otro lado, la fluorescencia de la proteína GFP es significativamente mayor que la generada por FbFP. De esta forma esperábamos obtener suficiente fluorescencia con la proteína sfGFP como para poder visualizar aquellas bacterias aceptoras del plásmido conjugativo.

Con el fin de cubrir el mayor espectro bacteriano posible de TC, decidimos obtener construcciones que contenían el gen *sfgfp* regulado por los promotores Ptet y Ptet2 e introducirlas en los dos plásmidos conjugativos mencionados anteriormente: R388 y RP4 (métodos, apartado 3.9.2.).

Una vez obtenidas las distintas construcciones en los distintos plásmidos conjugativos, se testó la fluorescencia expresada mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la Figura R6, la fluorescencia emitida por las cepas que contenían los plásmidos conjugativos con el gen que codifica para la proteína sfGFP era lo suficientemente elevada como para permitir la discriminación entre las células que contenían los plásmidos de las bacterias de la microbiota intestinal (heces).

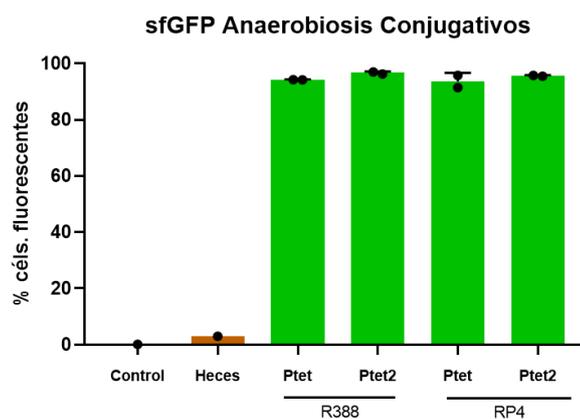


Figura R6. Las construcciones con el gen *sfgfp* introducidas en los plásmidos conjugativos expresan en condiciones de anaerobiosis niveles de fluorescencia suficientemente elevados como para poder diferenciar las bacterias aceptoras de plásmido por citometría. Porcentaje de células fluorescentes obtenidas para la cepa DH5 α con el gen *sfgfp* clonado bajo la acción de los promotores Ptet o Ptet2 e introducido en los plásmidos conjugativos R388 y RP4. Como controles negativos se utilizaron el plásmido R388 sin construcción fluorescente y una muestra de heces de ratón. Las barras representan la media y las líneas verticales la desviación típica

Nuestro último paso para la obtención de la bacteria donadora fue transferir por conjugación los plásmidos conjugativos que contienen las distintas construcciones del gen *sfgfp* a la cepa DH5 α Z1, que contiene en su genoma el represor para el promotor Ptet. Dicho represor debería ser capaz de inhibir la expresión del gen *sfgfp* de manera que nos permitiría diferenciar los transconjugantes (fluorescentes) de las bacterias donadoras (no fluorescentes) por citometría de flujo. Una vez obtenidas las cepas correspondientes, testamos si el represor era capaz de inhibir la emisión de fluorescencia. Como se puede apreciar en la figura R7, el número de células fluorescentes se redujo considerablemente cuando los plásmidos se introdujeron en la cepa DH5 α Z1. La adición al cultivo bacteriano de anidrotetraciclina (ATC), el inductor de Ptet, promovió la expresión de fluorescencia en los plásmidos que contenían la construcción Ptet::*sfgfp*. Cabe destacar que cuando se utiliza el promotor Ptet2, modificado para aumentar la fluorescencia de Ptet, el represor no fue capaz de reprimir la expresión en todas las células (Figura R7) lo cual podría suponer un problema a la hora de detectar TC, ya que nos podría dar un alto número de falsos positivos en caso de que la eficiencia de TC no fuera excesivamente alta. Por este motivo, el promotor Ptet2 no fue utilizado en los experimentos de diseminación *in vitro* y *ex vivo* que se describen a continuación.

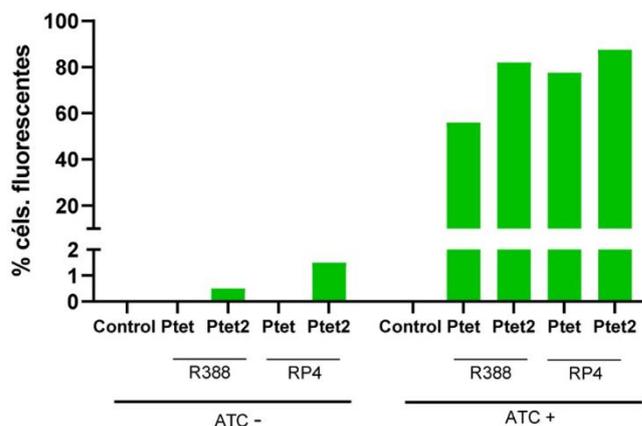


Figura R7. Represión de la fluorescencia por la cepa DH5αZ1 y restablecimiento de la misma al incubar los mismos cultivos con la molécula inductora. Porcentaje de células fluorescentes en la cepa DH5αZ1 (contiene represor para el promotor Ptet y Ptet2) conteniendo los plásmidos conjugativos R388 y RP4 con las construcciones Ptet::sfgfp y Ptet2::sfgfp. Las cepas se cultivaron tanto en ausencia (izquierda) como en presencia (derecha) del inductor (ATC). Como control negativo se utilizó la cepa DH5αZ1 sin la construcción que confiere fluorescencia.

4.1.2. Diseminación de los plásmidos conjugativos en un modelo *in vitro*

Una vez obtenida la bacteria donadora, se realizaron diversos experimentos *in vitro* con el fin de testar la capacidad de detectar la transferencia de plásmidos conjugativos mediante fluorescencia.

Inicialmente se comprobó la capacidad de diseminación de los plásmidos entre dos cepas de *E. coli* y la capacidad de detección de los TC tanto por cultivo en medio selectivo como por citometría. Para ello, se crecieron en anaerobiosis tanto la cepa donadora *E. coli* DH5αZ1 con las construcciones R388::Ptet::sfgfp (CU583) y RP4::Ptet::sfgfp (CU585), resistentes ambas a cloranfenicol, como la cepa aceptora *E. coli* DH5α resistente a estreptomicina (stp^R). Donante y aceptor se mezclaron en proporción 1:1 (5×10^7 bacterias de cada cepa) y se incubaron 24 h sobre una membrana de nitrocelulosa. Tras la incubación se crecieron en medio LB suplementado con los antibióticos necesarios para detectar TC y se analizó paralelamente por citometría de flujo el número de células fluorescentes.

Como se indica en la Figura R8C, ambas técnicas tenían la misma capacidad de detectar TC. Para las construcciones de las cepas donadoras se eligió el promotor Ptet

por no tener escape a la represión, lo que nos asegura que todas las células fluorescentes detectadas son resultado de la conjugación a la cepa sin represor y no falsos positivos. Por otro lado, utilizamos siempre como control del “gating” en citometría tanto la cepa donante como la aceptora crecidas de manera individual, comprobando que no había fluorescencia previa a la incubación conjunta de las cepas y confirmando así que todas las células fluorescentes observadas aparecen tras la conjugación. Cabe destacar que la ventana utilizada de fluorescencia para este experimento fue similar a la utilizada cuando incluíamos un control negativo de heces (con cierta fluorescencia basal). Por ello, al ser más restrictivos estamos eliminando algunas células fluorescentes que en este caso podríamos considerar también TC y que por tanto aumentarían la eficiencia de conjugación del plásmido. En cualquier caso, si hubiéramos sido menos restrictivos en el filtro utilizado por citometría, el resultado obtenido hubiera sido una mayor detección de eventos TC por fluorescencia, lo cual reforzaría la conclusión obtenida de que nuestro sistema es adecuado para detectar TGH.

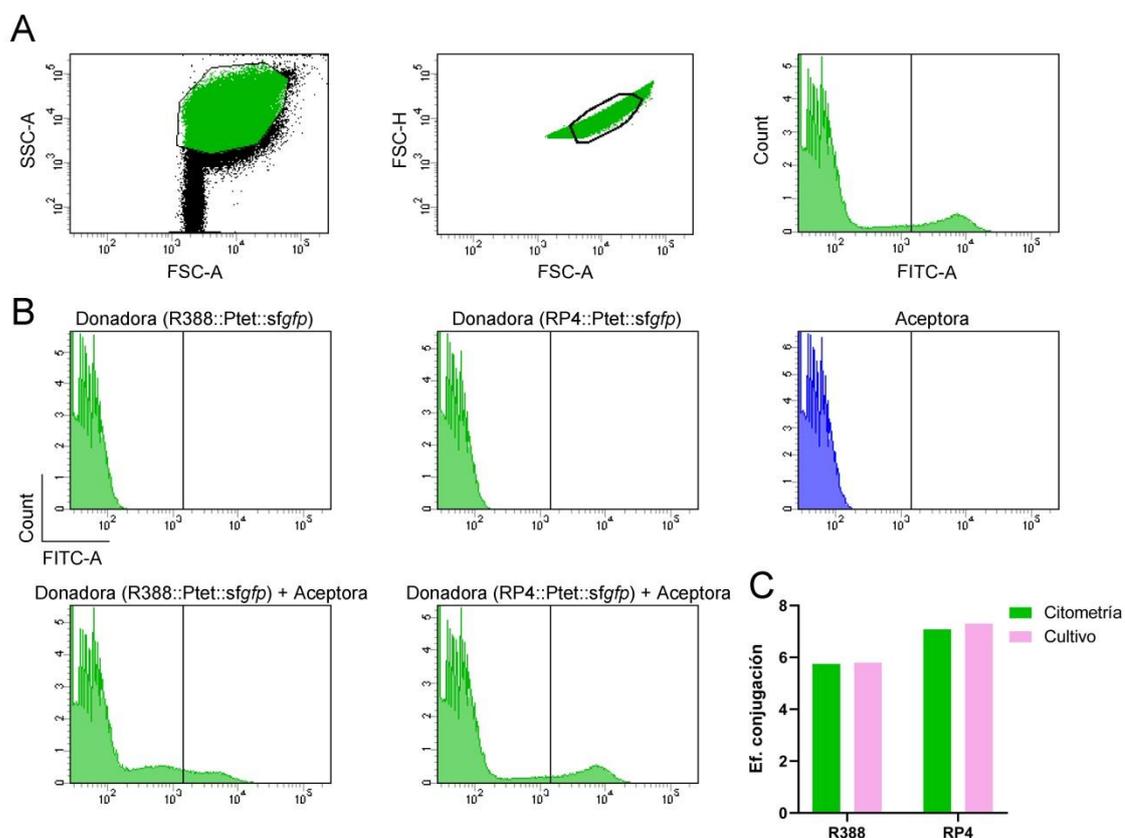


Figura R8. La detección de TC entre cepas de *E. coli* mediante citometría de flujo proporciona resultados similares a la detección por cultivo en medio selectivo. (A) Esquema general de

citometría utilizado para testar los experimentos *in vitro*, ejemplificado con una muestra en la que se incubaba la bacteria donadora (*E. coli* DH5 α Z1/RP4::Ptet::sfgfp) con la bacteria aceptora *E. coli* DH5 α stp^R. En primer lugar se seleccionan los eventos detectados según las características de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) esperados para nuestras células. A continuación se eliminan los agregados enfrentando en un gráfico el área (FSC-A) y la altura (FSC-H) de la señal fluorescente; se consideran singletes aquellos que cumplen una proporción 1:1 entre el área y altura de la señal fluorescente. A continuación se visualizan las bacterias en el canal FITC-A ($\lambda = 530 \pm 30$ nm) para el que esperamos que las bacterias que han adquirido el plásmido conjugativo emitan señal fluorescente. **(B-C)** Resultados obtenidos en la conjugación, utilizando como cepas donadoras, dos cepas derivadas de *E. coli* DH5 α Z1 que contienen los plásmidos conjugativos RP4 y R388 con el cassette Ptet::sfgfp y como cepa aceptora la cepa DH5 α stp^R. **(B)** Células fluorescentes detectadas en el canal FITC-A mediante citometría de flujo tanto para los controles negativos (cultivos puros de las cepas donadoras y aceptoras) como para las correspondientes conjugaciones obtenidas con las dos cepas donadoras y la cepa aceptora. **(C)** Eficiencia (Ef.) de conjugación calculada como número de TC detectados (número de células fluorescentes (FITC+) dividido por el número de células totales (Singletes) bien por citometría o detectados por cultivo (número de unidades formadoras de colonia (UFC) resistentes a estreptomycin y cloranfenicol dividido por el número total de UFC).

4.1.3. Diseminación de los plásmidos conjugativos en un modelo *ex vivo* con microbiota intestinal murina como población aceptora

Una vez comprobada la capacidad de la técnica basada en la citometría de flujo en la detección de TC, decidimos realizar experimentos *ex vivo* con el fin de detectar TC desde la bacteria donadora a bacterias de la microbiota intestinal.

Teniendo en cuenta que la fluorescencia de la proteína sfGFP es significativamente mayor que la generada por FbFP, se decidió recuperar el promotor Plac para testarlo junto al gen *sfgfp* en los dos plásmidos conjugativos (métodos, apartado 3.9.2) y poder aumentar así el posible rango de detección de bacterias aceptoras. Además, este promotor había sido utilizado con éxito anteriormente por Klümpler y colaboradores en el estudio de la diseminación de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos desde enterobacterias a la microbiota de suelo (6), por lo que su eficacia estaba ya testada. Tras hacer la construcción con el promotor Plac, comprobamos la fluorescencia de los plásmidos conjugativos en condiciones anaeróbicas. Como se observa en la figura R9, los niveles de fluorescencia para las construcciones con el Plac son ligeramente inferiores que los que se obtienen al utilizar

el promotor Ptet, pero lo suficiente como para poder distinguir sin ningún problema esta fluorescencia de la de las heces. Por otro lado, la cepa donadora DH5 α Z1 en la que finalmente se introducen los plásmidos conjugativos, presenta en su genoma, además del represor para el promotor Ptet, el represor para el promotor Plac, por lo que la incorporación de este promotor a nuestro modelo no presentó mayores complicaciones.

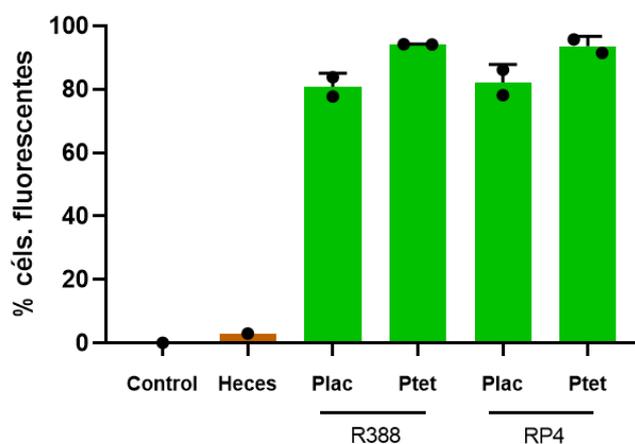


Figura R9. La construcción Plac::*sfgfp* introducida en los plásmidos conjugativos expresa en anaerobiosis niveles de fluorescencia suficientemente elevados como para poder diferenciar las bacteriasceptoras por citometría. Porcentaje de células fluorescentes obtenidas para la cepa DH5 α conteniendo las construcciones R388::Plac::*sfgfp* y RP4::Plac::*sfgfp*. Como controles negativos se utilizaron el plásmido R388 sin construcción fluorescente y una muestra de heces de ratón y como controles positivos la construcción Ptet::*sfgfp* en los dos plásmidos conjugativos. Las barras representan la media de los datos y las líneas verticales la desviación típica.

Con el fin de estudiar transferencia horizontal desde las cepas donadoras a las bacterias de la microbiota intestinal, el contenido cecal de ratones recién sacrificados se incubó en condiciones anaeróbicas junto con las células donadoras, cepas de *E. coli* DH5 α Z1 que contenían 4 tipos de plásmidos: R388::Ptet (CU583), RP4::Ptet (CU585), R388::Plac (CU753) y RP4::Plac (CU754) con el gen *sfgfp*, con el fin de poder cubrir el mayor espectro posible de transconjugantes (métodos, apartado 3.11.1).

Además, para asegurarnos que las bacteriasceptoras eran viables, se realizó el mismo experimento utilizando un cultivo del ciego de ratón como población aceptora. El cultivo del contenido cecal se obtuvo tras incubarlo durante 6 días en condiciones anaeróbicas en agar Columbia sangre (CBA), basándonos en estudios previos de nuestro grupo de investigación en el que se determinó que esas condiciones

y ese medio de cultivo eran idóneos para poder crecer la mayor diversidad de bacterias posibles de la microbiota intestinal (144). Tras la incubación de las células donadoras y receptoras en condiciones anaeróbicas (ver metodología) se llevaron las muestras a citometría para la detección de células fluorescentes.

Al utilizar el ciego de ratón como microbiota aceptora en nuestros experimentos, únicamente fuimos capaces de detectar TC con la muestra cultivada como aceptora y no con el ciego recién obtenido del ratón. Por tanto, los datos representados en los resultados se refieren a los TC obtenidos utilizando como células receptoras la microbiota murina cultivada en anaerobiosis durante 6 días en placas de CBA. Como se puede observar en la figura R10B, fuimos capaces de detectar células fluorescentes (TC) mediante citometría de flujo tanto para las conjugaciones obtenidas con el plásmido R388 como con el RP4, siendo la eficiencia de conjugación observada mayor para este último plásmido, independientemente del promotor utilizado. La eficiencia de conjugación media para las 3 muestras que tenemos con el plásmido R388 es de 0,035%, mientras que la eficiencia de conjugación media de las 4 muestras analizadas para el plásmido RP4 nos proporciona un valor medio de 1,67%; sin embargo, las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas (T-test, p valor= 0,0851) probablemente debido a la variabilidad existente entre las muestras y al bajo número de muestras. Cabe destacar que no se detectó ninguna célula fluorescente cuando analizamos por citometría de flujo las células donadoras o las células receptoras (i.e. contenido cecal cultivado) de manera independiente (antes de ser incubados juntos). En la figura R10 tan solo se muestran estos controles para las células receptoras y para la célula donadora que contiene el plásmido RP4 Ptet::sfGFP, aunque resultados similares se obtuvieron para las otras células donadoras.

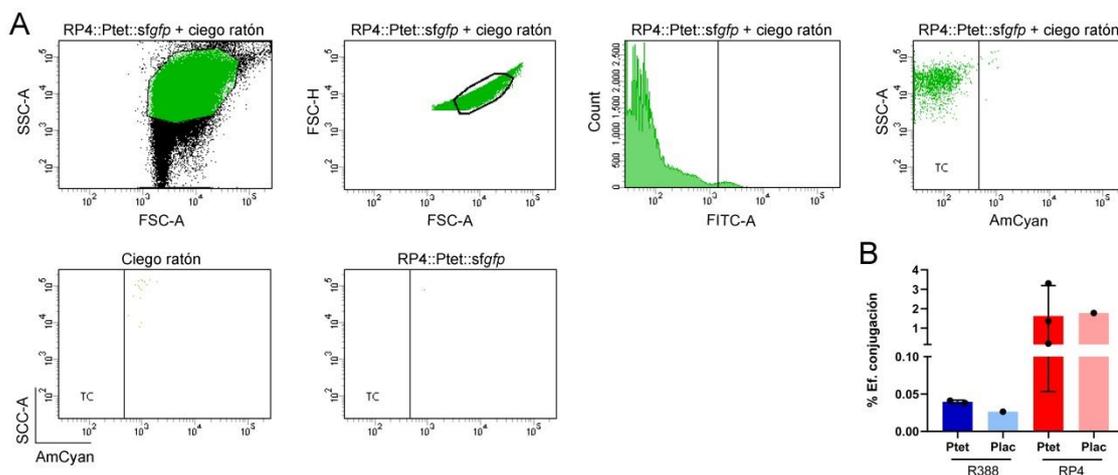


Figura R10. Los plásmidos conjugativos se transfieren a la microbiota intestinal murina. La microbiota intestinal murina (muestra de ciego de ratones) se incubó en condiciones anaeróbicas con las células donadoras que contenían los plásmidos R388 y RP4 con las construcciones Ptet::sfGFP y Plac::sfGFP. 24 h tras la incubación se realizó un análisis por citometría de flujo de las células fluorescentes con el fin de detectar los transconjugantes. **(A)** Esquema general de citometría utilizado para testar los experimentos *ex vivo* e *in vivo* ejemplificado con una muestra en la que observamos transconjugantes. En primer lugar, se seleccionan los eventos detectados según las características de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) esperados para nuestras células. A continuación, se eliminan los agregados enfrentando en un gráfico el área (FSC-A) y la altura (FSC-H) de la señal fluorescente; se consideran singletes aquellos que cumplen una proporción 1:1 entre el área y altura de la señal fluorescente. Después se visualizan las bacterias en el canal FITC-A ($\lambda = 530 \pm 30$ nm) para el que esperamos ver señal fluorescente. Para confirmar que la fluorescencia venía dada exclusivamente por GFP y descartar posibles partículas autofluorescentes, las células FITC+ fueron analizadas en un segundo canal fluorescente, AmCyan ($\lambda = 510 \pm 50$ nm). Si la señal es también positiva en AmCyan consideraremos que estamos ante partículas autofluorescentes y éstas serán descartadas del análisis, mientras que, si la señal es negativa en AmCyan, consideraremos que son TC. Como control de la estrategia de gating analizamos la fluorescencia en los mismos canales para los cultivos usados como donadores y aceptor (Ciego ratón). Como ejemplo se ha indicado tan solo el donador que contiene el plásmido RP4::Ptet::sfGFP. Resultados similares se obtuvieron con el resto de los donadores. **(B)** Eficiencia de conjugación para las muestras testadas usando como bacterias receptoras el contenido cecal de ratón cultivado y como donadoras las cepas *E. coli* DH5 α Z1 que contienen los plásmidos R388 y RP4 con las construcciones Ptet::sfGFP y Plac::sfGFP. La eficiencia fue calculada como número de TC (FITC+; AmCyan -) dividido por el número total de células (singletes). Para esta figura, las barras representan la media de los valores y las líneas verticales la desviación típica.

Una vez verificada la capacidad de transferencia de plásmidos conjugativos desde las cepas donadoras a bacterias de la microbiota intestinal, procedimos a purificar las células fluorescentes (FITC+; AmCyan -) detectadas en dos experimentos *ex vivo* diferentes mediante la técnica de “sorting” (métodos, apartado 3.15.). Esta técnica permite recuperar de manera estéril aquellas células seleccionadas por fluorescencia. En el primer experimento se utilizaron las cepas donadoras CU583 y CU585 conteniendo los plásmidos conjugativos R388::Ptet::sf gfp y RP4::Ptet::sf gfp respectivamente. Para el segundo experimento además de las cepas CU583 y CU585 se utilizaron también CU753 y CU754 con los plásmidos R388::Plac::sf gfp y RP4::Plac::sf gfp . Además, en este segundo experimento se secuenció también la microbiota cecal utilizada como población bacteriana aceptora de los EGM.

En la figura R11 se muestra un ejemplo de una de las purificaciones realizadas. Como se puede observar, se obtuvieron células fluorescentes al incubar la muestra de cultivo cecal con las bacterias que contenían el plásmido conjugativo (cultivo cecal + donador). Como control se realizó lo mismo con la muestra de cultivo cecal y con la bacteria donadora separadamente y apenas se apreciaron unas pocas células fluorescentes. Cabe destacar que el número de células detectado en el control es tan pequeño que no es capaz de amplificarse el gen del 16S rRNA mediante PCR *a posteriori*.

Una vez purificadas las células fluorescentes que contienen los eventos de TC, se extrajo el ADN, se amplificó y se secuenció el gen 16S rRNA para identificar la taxonomía de las bacterias TC. También se secuenciaron células no fluorescentes de las muestras de microbiota aceptora (cultivo cecal) para poder comparar las abundancias de TC con las abundancia de las bacterias que había en las muestras originales. Como comparativa, también se secuenciaron células no fluorescentes de la muestra del ciego sin cultivar. Tanto la separación celular como la extracción de ADN y la secuenciación masiva fueron realizadas por el grupo del Dr. Sorensen en la Universidad de Copenhague siguiendo la misma estrategia que hemos ido describiendo durante este trabajo. Sin embargo, el análisis de las secuencias fue realizado por nuestro grupo.

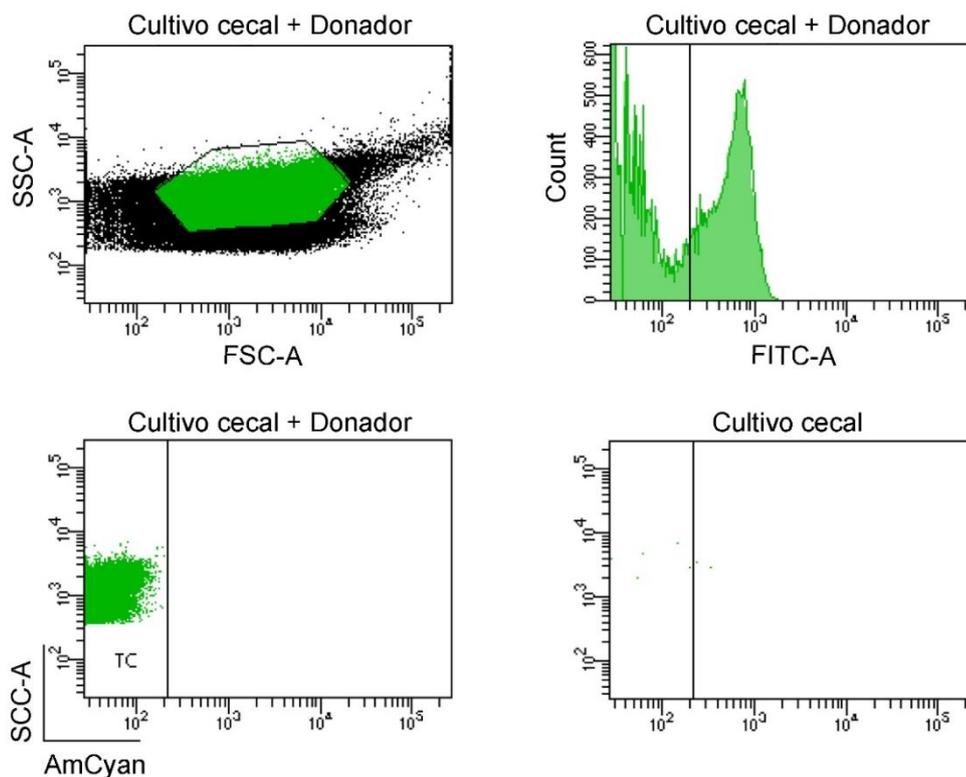


Figura R11. Separación celular de las bacterias fluorescentes detectadas por citometría de flujo para su posterior secuenciación y análisis. Esquema general utilizado para la separación celular de bacterias transconjugantes. En primer lugar se seleccionan los eventos detectados según las características de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) esperados para nuestras células. A continuación, se visualizan las bacterias en el canal FITC-A ($\lambda = 530 \pm 30$ nm) para el que esperamos ver señal fluorescente y las células positivas se analizan en un segundo canal fluorescente, AmCyan ($\lambda = 510 \pm 50$ nm). Si la señal es también positiva en AmCyan consideraremos que estamos ante células autofluorescentes, mientras que si la señal es negativa consideraremos que son bacterias TC, y serán aisladas en PBS estéril para la extracción de ADN. Como control de la estrategia de gating analizamos la fluorescencia en los mismos canales para el cultivo de contenido cecal de ratón utilizado como población aceptora (Ciego ratón).

Una vez purificadas las células fluorescentes, se procedió a la extracción de su ADN mediante el Kit GenePurgeDirect (Nimagen) (métodos, apartado 3.3.3.) y a la secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA mediante secuenciación masiva con la plataforma Illumina (métodos, apartado 3.16.1.). El gen 16S rRNA está presente en la totalidad de las bacterias y contiene regiones muy conservadas que nos permiten diseñar cebadores para amplificar dicho gen en todas las bacterias, en este caso, los cebadores empleados para la amplificación fueron Uni341F y Uni806R (métodos, Tabla M4). Este gen contiene además regiones que varían entre los diferentes tipos de bacterias, por lo que aquellas que están filogenéticamente más próximas contienen

secuencias más similares que las que están alejadas, lo que nos permite establecer clasificaciones taxonómicas de las secuencias y por tanto identificar las bacterias a las que se ha transferido el plásmido.

Como control del proceso, además de las células fluorescentes separadas, también se extrajo ADN del PBS que fluye por los conductos del citómetro y que se utiliza en los tubos de recogida de células. Los ADNs extraídos de las distintas muestras se amplificaron mediante los cebadores que hibridan con el gen 16S rRNA, indicados previamente, y los amplificados obtenidos se secuenciaron en la plataforma MiSeq (Illumina). Como control, también se secuenció el control negativo de la PCR del gen 16S rRNA para descartar posibles contaminaciones. Las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas fueron posteriormente procesadas mediante el paquete de software DADA2 que realiza una serie de filtrados para intentar corregir los posibles errores en las secuencias que se hayan podido generar durante el proceso de secuenciación (métodos, apartado 3.17.1.). De esta manera, el programa DADA2 identifica todas aquellas variantes únicas del gen 16S rRNA que se han identificado en las muestras analizadas, lo que se denomina ASVs (amplicon sequence variants) y nos indica el número de veces que dichas ASVs fueron detectadas en cada muestra.

Las ASVs detectadas en los controles negativos fueron eliminadas del análisis excepto en el caso de que se cumpliera el siguiente criterio: que la media de la abundancia de dicha ASV en las muestras de aceptores o transconjugantes fuese más de 5 veces superior a la abundancia máxima de esa misma ASV en los controles negativos. En estos casos se asumió que podía haber existido una contaminación de los controles negativos con bacterias procedentes de las muestras de aceptores o transconjugantes. Aplicando este último criterio, únicamente se mantuvieron en el análisis 2 ASVs que habían aparecido en alguno de los controles negativos. Estas ASVs pertenecen a los géneros *Staphylococcus* y *Alloprevotella*. Además, también se eliminaron todas aquellas ASVs pertenecientes al género *Escherichia/Shigella* que tuvieran 3 nucleótidos o menos de diferencia con la secuencia del 16S rRNA de la bacteria donadora por evitar que se tratase de bacterias donadoras en las que hubiese habido un escape del represor y su fluorescencia les haya hecho pasar por TC.

En las tablas R1A y B se recogen, tanto para los controles negativos como para las muestras analizadas, los valores del número de secuencias obtenidas iniciales (Inicial), así como el número de secuencias que se mantienen en el análisis tras pasar los parámetros de calidad de DADA2 y eliminar tanto aquellas bacterias que sospechamos podrían ser donadoras con escape de fluorescencia como las que aparecían en los controles negativos y podían representar falsos positivos (Final). Como podemos ver en las tablas, el número de secuencias tras aplicar los filtros mencionados (Final) disminuye pero se mantiene en unos niveles suficientes como para poder realizar los análisis que se describirán a continuación. En el caso de los controles negativos, somos capaces de eliminar totalmente las secuencias o reducirlas a valores inferiores al 0,005% del número de secuencias iniciales.

Tabla R1. Número de lecturas obtenidas para cada muestra tras la secuenciación del gen 16S rRNA antes y después de aplicar los filtros indicados. (A) Resultado de la secuenciación del gen 16s rRNA de las células fluorescentes aisladas por sorting en los dos experimentos (Experimento 1 y 2) tras incubar la microbiota intestinal murina cultivada junto con bacterias donadoras con distintas combinaciones de plásmidos (R388 o RP4) y promotor (Ptet o Plac) con el gen de fluorescencia *sfgfp*, así como la secuenciación de la microbiota cecal (bacterias no fluorescentes) utilizada como población aceptora (cultivada – C, o no cultivada –NC). La media de los valores se muestra en la última fila de la tabla. **(B)** Resultado de la secuenciación del PBS usado en el proceso de sorting (PBS), el agua del kit de extracción de ADN (Agua) y los amplificadores del control negativo de la primera reacción de PCR del proceso de secuenciación (1PCR) utilizados como controles del proceso.

A

	Muestra	Inicial	Final
TC Experimento 1	R388::Ptet	2,2 x10 ⁵	5,6 x10 ⁴
	RP4::Ptet	3,9 x10 ⁵	5,6 x10 ⁴
TC Experimento 2	R388::Ptet	1,6 x10 ⁵	8,9 x10 ³
	RP4::Ptet	1,1 x10 ⁵	1,8 x10 ⁴
	R388::Lac	9,5 x10 ⁵	3,2 x10 ⁴
	RP4::Lac	1,2 x10 ⁵	1,3 x10 ⁴
Recipientes	NC	6,2 x10 ⁴	3,1 x10 ⁴
	C	7,7 x10 ⁴	3,5 x10 ⁴
Media		1,5 x10 ⁵	3,1 x10 ⁴

B

	Inicial	Final
PBS	8,3 x10 ⁴	2
Agua	1,7 x 10 ⁵	279
1PCR	1 x 10 ⁵	0
Media	1,2 x 10 ⁵	93,7

A partir del número de secuencias que se muestra en la columna “Final” de la tabla R1A, analizamos en primer lugar la estructura global de las poblaciones bacterianas secuenciadas mediante la distancia UniFrac, como medida de la diferencia entre la microbiota de diferentes muestras (métodos, apartado 3.17.2) y representamos esta distancia mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). La cercanía de las muestras en estos gráficos refleja su similitud en cuanto a composición microbiana. Como se observa en la figura R12A, la primera coordenada, que explica un 23,38 % de las diferencias encontradas entre los grupos, separa las muestras en función de si se trata de la microbiota aceptora o de las bacterias TC separadas por citometría. Este resultado indica que las muestras TC se parecen más entre sí que a las muestras aceptoras independientemente de cuál haya sido el plásmido o promotor utilizado para los experimentos. Además, la aplicación del test PERMANOVA demostró que las poblaciones bacterianas de TC y las aceptoras se diferencian significativamente (p valor = 0,028). Para poder analizar en más detalle las diferencias entre estos dos grupos se realizó una clasificación filogenética de las ASVs detectadas y se representó la abundancia relativa de los taxones más predominantes mediante diferentes colores evidenciando una expansión de Proteobacterias, Actinobacterias y ciertos Firmicutes en las muestras donde se observan bacterias TC frente a las muestras de la microbiota aceptora (Figura R12B). Además, también se calculó el índice de diversidad Shannon a nivel de ASV (métodos, apartado 3.17.1) como medida de la diversidad bacteriana. Como se puede observar en la figura R12C, existe una disminución de la diversidad bacteriana en las muestras de TC en comparación con las poblaciones aceptoras; sin embargo, esta disminución no es

estadísticamente significativa probablemente debido al pequeño número de muestrasceptoras (N=2) de las que disponemos (T-test, p valor = 0,0836). Todos estos resultados son un indicativo de que los plásmidos conjugativos que estamos estudiando no se transfieren por igual a toda la población bacteriana, sino que parece existir una predilección por ciertas bacterias, incluidos los filos Proteobacteria y Actinobacteria.

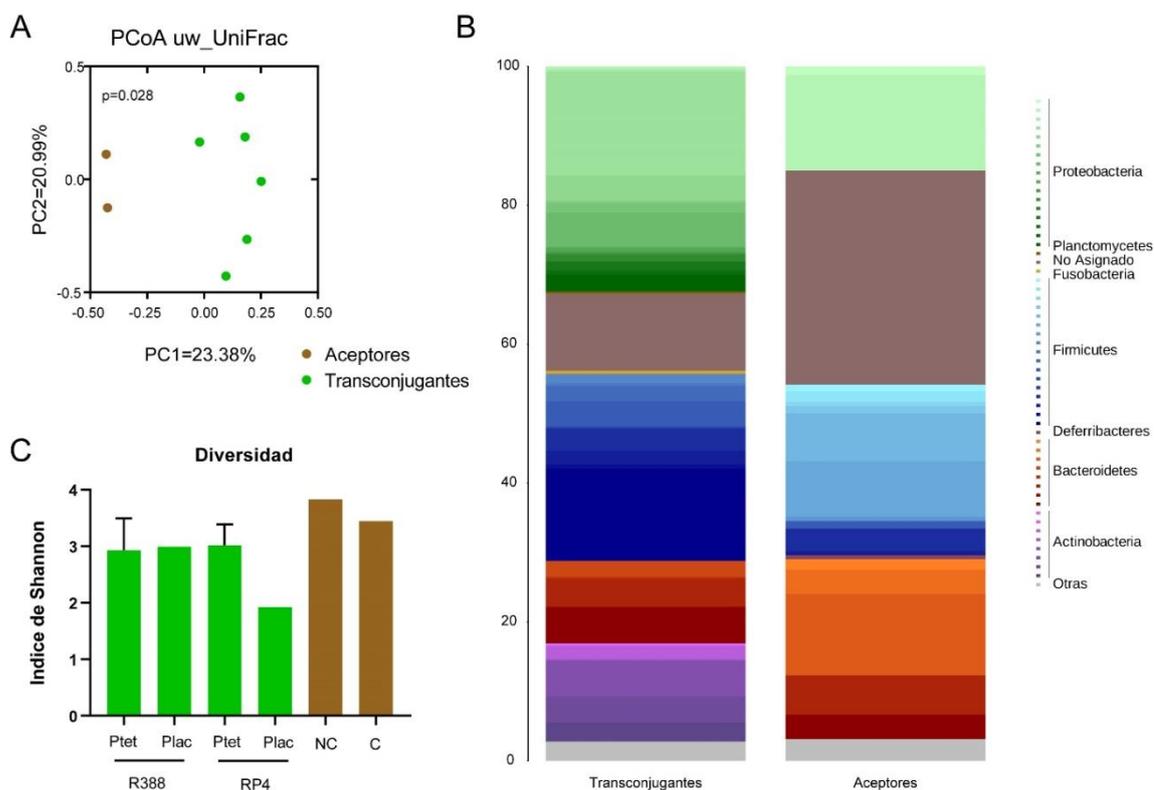


Figura R12. Los análisis globales del gen 16S rRNA indican la existencia de diferencias entre la microbiota cecal murina que se usa como población aceptora y las bacterias que adquieren los plásmidos conjugativos. (A) Análisis de Coordenadas Principales basado en la distancia unweighted UniFrac en el que se observan diferencias significativas entre las muestras de microbiota aceptora (marrón, N=2) y las muestras en las que se detectan TC (verde, N=6). El p valor obtenido al aplicar el test PERMANOVA fue p=0,028 **(B)** Clasificación filogenética de las secuencias del gen 16S rRNA. Las barras representan la composición de la microbiota del conjunto de muestras clasificadas como transconjugantes (células FITC+, AmCyan- aisladas por sorting; N=6) o comoceptoras (microbiota cecal murina; N=2). La abundancia relativa de los taxones predominantes obtenidos por clasificación de las secuencias del gen 16S rRNA se muestran con diferentes colores, a la derecha los hemos agrupado en función del filo al que pertenecen. **(C)** Diversidad microbiana medida mediante el índice de Shannon. Cada barra corresponde con un tipo de muestra analizada. En verde se representan las muestras transconjugantes (con las diferentes combinaciones de promotor (Ptet o Plac) y plásmidos (R388 o RP4) testados, y en marrón las muestras correspondientes a la microbiota cecal murina sin cultivar (NC) o cultivada (C) usada como aceptora en los experimentos. Para las

bacterias que adquieren la construcción R388::Ptet o RP4::Ptet disponemos de dos réplicas por lo que la barra representa la media y las líneas verticales la desviación típica.

Posteriormente identificamos aquellos taxones en los cuales habíamos detectado TC. Este análisis se hizo a todos los niveles, desde el más general (filo), hasta el más específico que podemos llegar con la región del 16s rRNA secuenciada (género). En la figura R13 se muestra el % de taxones del total detectados para cada nivel donde encontramos TC. Como se puede apreciar, hemos agrupado las muestras dependiendo del tipo de plásmido o del tipo de promotor utilizado. Cabe destacar que las muestras donde encontramos TC en una mayor diversidad de bacterias son aquellas donde se utilizó el plásmido R388, el cual fue detectado en el 76,5% del total de géneros identificados en todas las muestras, incluidas las muestras aceptoras. Además, TC del plásmido R388 se detectó en alrededor del 90% de las familias, órdenes, clases y filos taxonómicos detectados de forma general tras la secuenciación masiva de las muestras. Sin embargo, el plásmido RP4 presenta porcentajes bastante menos elevados, detectándose en un 29% de los géneros totales y alcanzando como máximo el 50% para el resto de las clases taxonómicas. Estos resultados parecen indicar que la microbiota murina presenta una mayor facilidad para la adquisición del plásmido R388, que aparece de forma prácticamente generalizada en la taxonomía analizada. Sin embargo, cuando aplicamos un test estadístico, no observamos diferencias significativas entre ambos tipos de plásmidos probablemente debido a la gran variabilidad entre distintas muestras. Como se puede apreciar en la figura R14, en dos muestras el plásmido R388 se detectó en un gran número de géneros mientras que en otra de las muestras, la diversidad de los géneros donde se encontró el plásmido era considerablemente menor. Si agrupamos las muestras en función del promotor utilizado, podemos observar cómo las construcciones que contienen Plac parece que se transfirieron a un mayor número de taxones en comparación con lo que ocurre con las construcciones que contienen Ptet. Por ejemplo, se ha detectado plásmidos con la construcción Ptet en el 45,8% de los géneros y el 59,8% de las familias detectadas, mientras que los porcentajes para el Plac ascienden al 60,3% de los géneros y el 80,3% de las familias. De nuevo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa probablemente debido a la variabilidad entre muestras (Figura R14). El resto de las

clases taxonómicas siguen la misma tendencia que las ya comentadas como puede observarse en la figura R13.

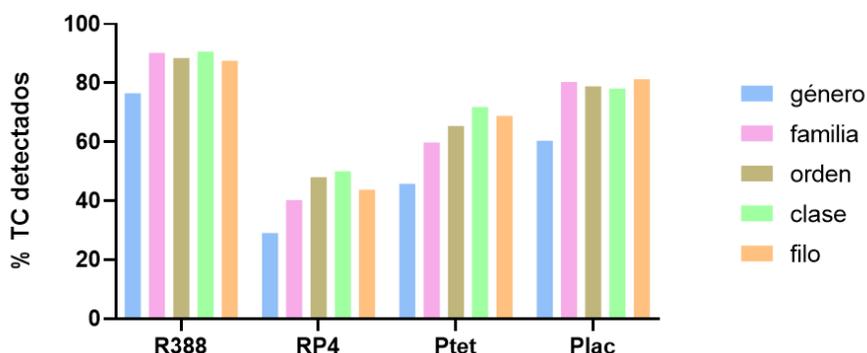


Figura R13. Porcentaje de TC detectados para cada uno de los niveles filogenéticos estudiados. El gráfico representa el porcentaje de géneros, familias, órdenes, clases y filos bacterianos diferentes detectados cuando agrupamos las muestras que contienen bacterias TC en función del plásmido adquirido (R388 o RP4) o del promotor presente en la construcción (Ptet o Plac) con respecto al total de taxones de ese nivel taxonómico detectado por secuenciación del gen 16S rRNA. Como ejemplo, si detectamos un total de 10 clases bacterianas, un 50% indicaría que hemos detectado TC en 5 de las 10 clases. N de los grupos: R388=3, RP4=3, Ptet=4, Plac=2.

Cabe destacar, como vemos en la figura R14, que somos capaces de detectar TC en los filos más abundantes de la microbiota (Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria) además de en otros menos abundantes (Fusobacteria), pero que existe mucha variabilidad entre las distintas muestras, como ya hemos indicado anteriormente. Además, encontramos TC en todas las clases más abundantes dentro de los filos ya descritos (Clostridia, Bacilli, Bacteroidia, Actinobacteria, Alpha, Beta y Gammaproteobacteria).

Centrándonos en el nivel de género, la secuenciación del gen 16S rRNA bacteriano es capaz de detectar 180 géneros diferentes en las muestras analizadas (ver Anexos, Tabla A1 donde se indica la abundancia relativa y los nombres de todos los géneros mostrados en la Figura R14 y donde se indica la abundancia de TC en cada uno de estos géneros para cada una de las conjugaciones realizadas). De estos géneros, 148 (82,2%) fueron identificados en alguna de las muestras de TC y en 56 de ellos (29,4%) se ha podido verificar el evento de conjugación en más de una ocasión (es decir, en más de una muestra analizada se ha detectado ese género). Este importante descenso en el número de géneros en los que se detectaron TC en 1 o en al menos 2 muestras se

debe probablemente a la gran variedad de géneros en los que se detectaron TC para el plásmido R388::Plac::sfgfp. Cabe destacar que, sólo 23 de los géneros en los que se ha detectado adquisición de alguno de los plásmidos se detectaban también en la microbiota aceptora murina (ej. *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, etc.), mientras que los 125 restantes (69,4 % del total) no son detectados en las muestras aceptoras. Este sorprendente resultado probablemente se deba a que los géneros donde se transfieren los plásmidos con más frecuencia presentan un abundancia muy baja en la microbiota aceptora (ej. *Pseudomonas*, *Pseudocitrobacter*, *Fusobacterium*, *Staphylococcus*, etc.). Hay que tener en cuenta que en el sorting se purificaron aproximadamente 10000 células. Por tanto, aquellas bacterias cuya abundancia en la microbiota aceptora se encuentren por debajo de 1/10000) células, no se van a detectar en la microbiota aceptora pero puede que sí se detecten en otras muestras si dichas bacterias son muy eficientes a la hora de aceptar los plásmidos. Por tanto, teniendo en cuenta que la mayoría de los géneros bacterianos donde detectamos TC están por debajo de este umbral en la microbiota aceptora, este resultado sugiere que estos géneros muy poco abundantes son muy eficaces en la captación de los plásmidos conjugativos estudiados.

Puesto que solo pudimos realizar el ensayo de conjugación con la microbiota cultivada (no obtuvimos TC con la microbiota cecal directamente obtenida del ratón) decidimos comparar el número de géneros detectados en la microbiota cultivada y no cultivada para identificar cuanta diversidad estábamos perdiendo con el cultivo. El cultivo de la microbiota cecal murina redujo de 47 a 34 los géneros detectados en la población aceptora. Es decir, que al hacer el experimento con la microbiota cultivada estamos perdiendo parte de la diversidad a la que se podrían transferir los plásmidos, sin embargo, aún se mantienen la mayoría de los géneros iniciales detectados en la microbiota sin cultivar.

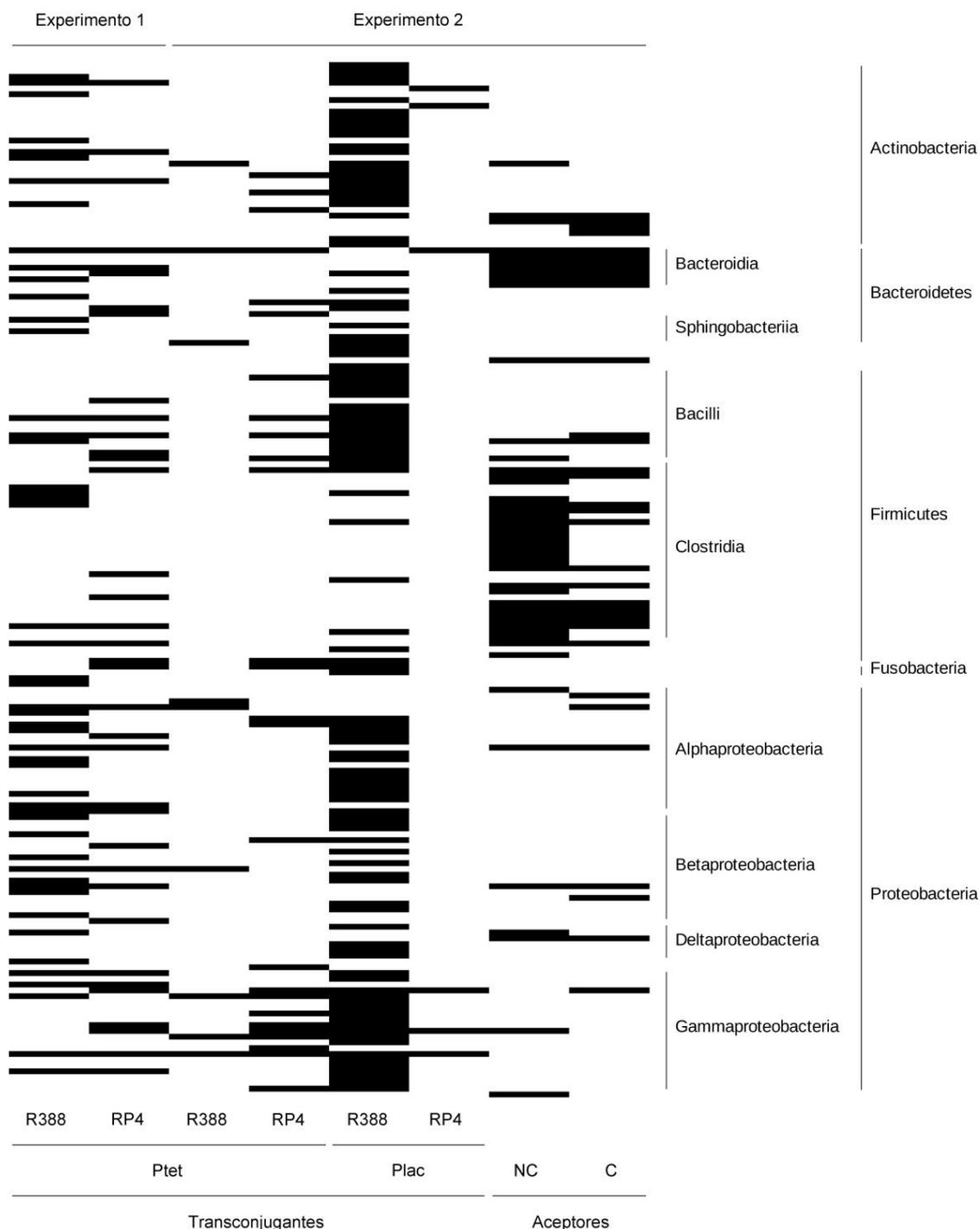


Figura R14. Los plásmidos conjugativos se transfieren a una gran diversidad de bacterias de la microbiota intestinal murina. Análisis por secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las células fluorescentes purificadas (Transconjugantes) en las diferentes combinaciones de plásmido (R388 o RP4) y promotor (Ptet o Plac) testadas. También se secuenció el gen 16S rRNA del contenido cecal original (Aceptores) tanto cultivado (C), como sin cultivar (NC). Únicamente se pudieron detectar TC utilizando la microbiota cecal murina cultivada, sin embargo, se secuenció también la microbiota cecal sin cultivar para poder evaluar el efecto del cultivo sobre las bacterias. El heatmap indica presencia (negro) o ausencia (blanco) de los distintos géneros bacterianos detectados en los dos experimentos (Experimento 1 y 2). A la derecha se indica la clase bacteriana y el filo al que pertenecen dichos géneros identificados.

Posteriormente nos centramos en identificar aquellos géneros bacterianos que consideramos los mejores aceptores de los plásmidos conjugativos estudiados, es decir, aquellos en los que observamos TC en más del 33% de los casos testados. Es decir, para un género dado (ej. *Bacteroides*) en al menos 3 de las 6 conjugaciones realizadas hemos detectado TC que fueron clasificados como *Bacteroides*. Es el caso de los 22 géneros bacterianos representados en la figura R15, que suponen cerca del 15% de los géneros en los cuales hemos detectado TC en al menos una ocasión (148 géneros). En dicha figura podemos observar el porcentaje de muestras en las que se ha encontrado cada uno de esos géneros (columna TODOS). Además, también se agrupan las muestras en función del plásmido utilizado o del promotor presente en la construcción, lo cual nos permite visualizar más fácilmente posibles patrones en la diseminación de los plásmidos conjugativos.

		TODOS (6)	R388 (3)	RP4 (3)	Ptet (4)	Plac (2)	
Actinobacteria		Corynebacterium	50	67	33	50	50
		Micrococcus	50	67	33	50	50
		Rhodococcus	50	67	33	50	50
Bacteroidetes		Bacteroides	83	67	100	100	50
Firmicutes	Bacilli	Staphylococcus	67	67	67	75	50
		Enterococcus	67	67	67	75	50
		Streptococcus	50	33	67	50	50
		inc. sed.	50	33	67	50	50
		Veillonella	50	33	67	50	50
Fusobacteria		Fusobacterium	50	33	67	50	50
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobium	50	67	33	75	0
		Pseudochrobactrum	50	67	33	50	50
		Sphingomonas	50	67	33	50	50
	Betaproteobacteria	Pelomonas	50	67	33	75	0
		Aeromonas	50	67	33	50	50
	Gammaproteobacteria	Escherichia/Shigella	67	33	100	50	100
Pseudocitrobacter		67	100	33	75	50	
Haemophilus		50	33	67	50	50	
Acinetobacter		67	33	100	50	100	
Enhydrobacter		50	67	33	50	50	
	Pseudomonas	100	100	100	100	100	
	Stenotrophomonas	50	67	33	50	50	

Figura R15. Representación de los géneros bacterianos de la microbiota intestinal murina con mayor eficiencia en la adquisición de plásmidos conjugativos. Representación de la frecuencia de detección de TC en los géneros microbianos detectados por secuenciación del gen 16S rRNA. Solo se muestran aquellos géneros de los que se pudieron detectar TC en al menos 33% del total de las conjugaciones realizadas. Las conjugaciones realizadas se han agrupado en función del plásmido conjugativo (R388 o RP4) o el promotor de la construcción (Ptet o Plac). La primera columna (TODOS) recoge los resultados globales del total de conjugaciones realizadas. El número entre paréntesis indica el tamaño muestral de cada grupo (i.e. conjugaciones realizadas). El número dentro de las cajas de colores indica el % de las conjugaciones realizadas de ese tipo donde se detectó un TC de ese género. El color es indicativo de dicho %, cuanto más intenso, mayor el %.

Entre los géneros detectados como más relevantes en la adquisición de plásmidos encontramos 12 géneros pertenecientes al filo Proteobacteria de los cuales 8 pertenecen a la clase Gammaproteobacteria (*Aeromonas*, *Escherichia/Shigella*, *Pseudocitrobacter*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*), 3 a la clase Alphaproteobacteria (*Bradyrhizobium*, *Pseudochrobactrum* y *Sphingomonas*) y 1 de los géneros perteneciente a la clase Betaproteobacteria (*Pelomonas*). También encontramos 5 géneros del filo Firmicutes entre ellos *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* que se agrupan en la clase Bacilli, *Veillonella* y bacterias de la familia Clostridiaceae a las cuales no se les pudo asignar un género en concreto; así como 3 géneros del filo Actinobacteria (*Corynebacterium*, *Micrococcus* y *Rhodococcus*). Además, encontramos los géneros *Bacteroides* y *Fusobacterium* que no agrupan en niveles taxonómicos superiores con el resto de los géneros detectados.

Es importante señalar que varios de estos géneros en los que detectamos transferencia de los plásmidos conjugativos con resistencia a antibióticos incluyen bacterias que suelen causar infecciones oportunistas en humanos (i.e. *Pseudomonas*, *Escherichia/Shigella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*), lo que implica que estas bacterias tienen facilidad para adquirir por conjugación genes de resistencia a antibióticos que pueden dificultar su tratamiento. Por otro lado, también vemos transferencia a bacterias comensales que se encuentran frecuentemente en ratones (i.e. *Veillonella*, *Bacteroides*) y que podrían actuar como reservorio de estas multirresistencias y transferirlas posteriormente a otros patógenos que colonizasen el intestino.

Al realizar un análisis global de los resultados, encontramos dos géneros bacterianos capaces de adquirir los plásmidos conjugativos de forma muy eficiente, pues son detectados en más del 80% del total de muestras de TC (columna TODOS de la figura R15). Estos géneros son: *Pseudomonas*, presente en la totalidad de las muestras de TC analizadas y que, como ya hemos comentado anteriormente no se detecta en las muestras de microbiota aceptora, y *Bacteroides*, presente en el 83% de las muestras de TC y que sí pudimos detectar también en la muestra en la que se secuenció la microbiota aceptora (Anexos, Tabla A1).

Si analizamos la transferencia en función del plásmido conjugativo, podemos detectar ciertas diferencias en los patrones de diseminación. A pesar de compartir todos los géneros bacterianos, la frecuencia en la que encontramos el plásmido R388 suele ser mayor en géneros de los filos Actinobacteria y Proteobacteria a excepción de algunos casos concretos como los géneros *Acinetobacter* y *Escherichia/Shigella* que se encuentran más representados en los TC del plásmido RP4. En el caso del plásmido RP4 parece estar más representado en las bacterias del filo Firmicutes. Aunque hay que tomar con precaución estas comparaciones ya que tan solo hemos analizado 3 muestras de TC por plásmido y serían necesarias un mayor número de réplicas experimentales para poder llegar a tener conclusiones más robustas. En cualquier caso, el hecho de que estos géneros hayan adquirido tanto el plásmido R388 como el RP4, refuerza la idea de que no se trata de eventos de adquisición puntuales o fortuitos, sino que se trata de bacterias con una mayor predisposición a adquirir los plásmidos conjugativos que estudiamos. En caso de centrarnos en el promotor que acompaña al gen que codifica la proteína fluorescente, las mayores diferencias se observan con los géneros *Bradyrhizobium* y *Pelomonas*, que están presentes en un 75% de las muestras con Ptet mientras que no se han detectado TC de estos géneros bacterianos al utilizar el promotor Plac. En sentido inverso encontraríamos los géneros *Escherichia/Shigella* y *Acinetobacter*, que se han detectado en todas las muestras con el promotor Plac mientras que únicamente en el 50% de las muestras con el promotor Ptet. De nuevo, hay que tomar con precaución estas comparaciones debido a que el tamaño muestral es bajo y distinto dependiendo del promotor (4 muestras secuenciadas con TC de construcciones que contienen el promotor Ptet y solo 2 para el promotor Plac).

4.1.4. Diseminación de los plásmidos conjugativos en un modelo *ex vivo* con microbiota intestinal humana como población aceptora

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento anterior, decidimos estudiar si el mismo nivel de diseminación se observaría utilizando como bacteriasceptoras las provenientes de una muestra fecal humana. Se realizaron dos experimentos utilizando como bacteriasceptoras una muestra de heces recién obtenida de un individuo sano, así como las bacterias obtenidas tras cultivar la muestra de heces durante 6 días en CBA en anaerobiosis. Como células donadoras se utilizaron cepas de *E. coli* DH5 α Z1 que contenían los mismos tipos de plásmidos: R388::Ptet, RP4::Ptet, R388::Plac y RP4::Plac con el gen *sfGFP*, con el fin de poder cubrir el mayor espectro de posibles conjugantes. En este caso, tras las 24 h de incubación de células donadoras con receptoras, fuimos capaces detectar TC en todas las condiciones, tanto en heces no cultivadas (Figura R16) como cultivadas (Figura R17) y con todas las combinaciones de plásmido y promotor disponibles (Figura 16B y 17B). Los resultados sugieren que la eficiencia de conjugación es mayor para los plásmidos RP4 tanto al utilizar la microbiota cultivada (T-test, p valor = 0,0121) como con la microbiota sin cultivar, aunque en este segundo caso las diferencias no son estadísticamente significativas (T-test, p valor = 0,2598). Por otro lado, los datos parecen indicar que no existen diferencias a nivel de la eficiencia de conjugación entre ambos tipos de microbiota aceptora (cultivada o no cultivada. T-test, p valor = 0,1463) Como controles se utilizaron las cepas donadoras y las receptoras por separado, no detectándose en ellas ninguna células fluorescente mediante citometría de flujo (Figura R16A, Figura R17A). En las figuras se muestra tan solo un tipo de célula donadora (la que contiene la construcción RP4::Ptet::sfGFP), pero exactamente el mismo resultado se obtuvo con el resto de células donadoras cuando se cultivan de manera individual (0 células fluorescentes). También usamos como control en los experimentos de conjugación cepas de *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido vector pCN47 con la construcción Plac::sfGFP que se incubaron junto con la microbiota aceptora siguiendo el mismo protocolo que el resto de las conjugaciones. Como cabía esperar, puesto que el plásmido pCN47 no es un plásmido conjugativo, no se observó transferencia de este plásmido a la microbiota (Figura R16B, Figura R17B).

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

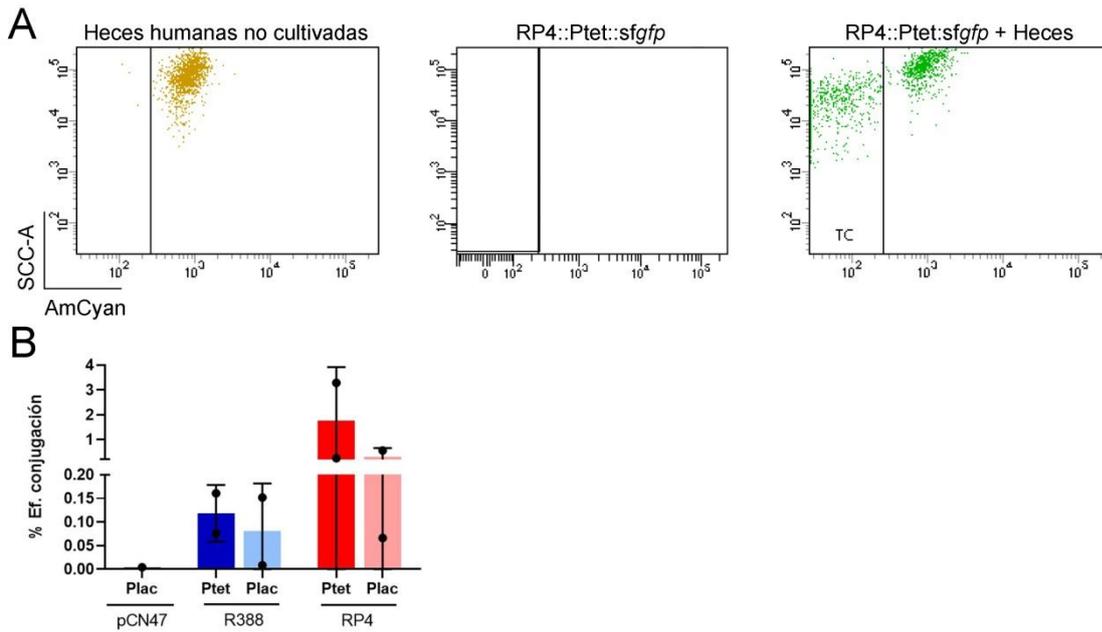


Figura R16. Los plásmidos conjugativos se transfieren a la microbiota intestinal humana sin cultivar. La microbiota intestinal humana sin cultivar se incubó en condiciones anaeróbicas con las células donadoras que contenían los plásmidos R388 y RP4 con las construcciones Ptet::sfGFP y Plac::sfGFP. 24 h tras la incubación se analizaron por citometría de flujo las células fluorescentes con el fin de detectar los transconjugantes. **(A)** Última ventana (SSC vs AmCyan) de la estrategia de detección de células fluorescentes para la conjugación de la cepa donadora con construcción RP4::Ptet::sfGFP con la microbiota humana y los respectivos controles (tanto población donadora como aceptora previas a ser incubadas juntas). Las células positivas para FITC se analizan en segundo canal fluorescente, AmCyan ($\lambda = 510 \pm 50$ nm) para poder diferenciar los TC de bacterias autofluorescentes de la microbiota intestinal. Si la señal es también positiva en AmCyan consideraremos que estamos ante células autofluorescentes, mientras que si la señal es negativa consideraremos que son TC. **(B)** Eficiencia de conjugación para las muestras testadas usando muestra fecal humana no cultivada como microbiota aceptora, y las cepas *E. coli* DH5 α Z1 que contienen los plásmidos R388 y RP4 con las construcciones Ptet::sfGFP y Plac::sfGFP como donadoras. La eficiencia fue calculada como número de TC (FITC+; AmCyan -) dividido por el número total de células (singletes). Como control se muestra el plásmido no conjugativo pCN47::Plac::sfGFP testado en las mismas condiciones. Las barras representan la media de los datos de eficiencia y las líneas verticales la desviación típica.

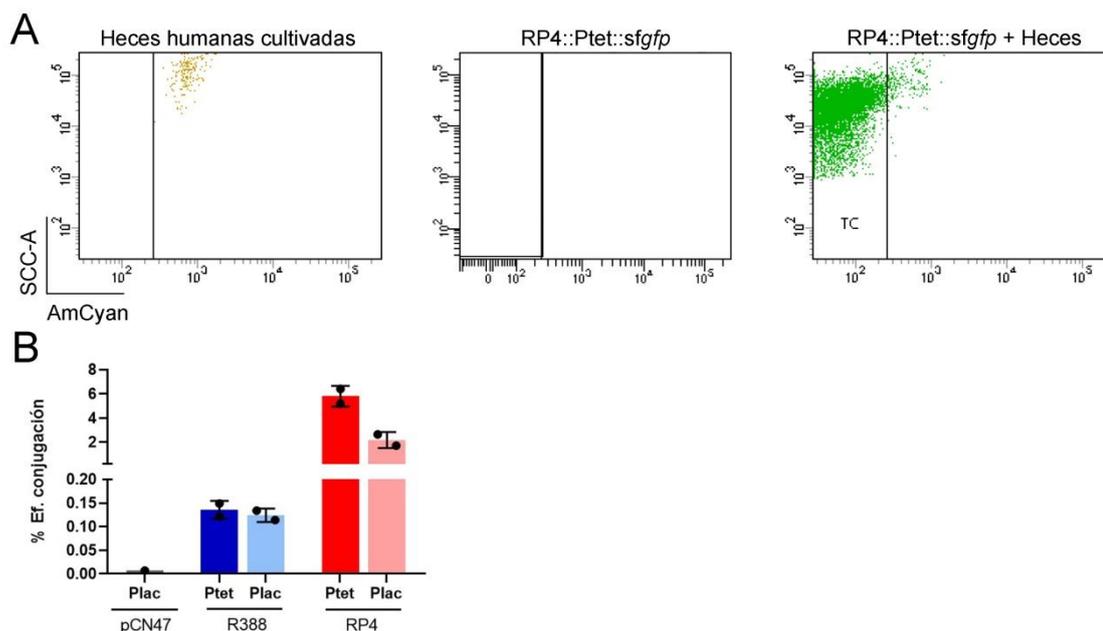


Figura R17. Los plásmidos conjugativos se transfieren a la microbiota intestinal humana cultivada. La microbiota intestinal humana cultivada durante 6 días en placas de CBA se incubó en condiciones anaeróbicas con las células donadoras que contenían los plásmidos R388 y RP4 con las construcciones Ptet::sfgfp y Plac::sfgfp. 24 h tras la incubación se realizó un análisis por citometría de flujo de las células fluorescentes con el fin de detectar los transconjugantes. **(A)** Última ventana (SSC vs AmCyan) de la estrategia de detección de células fluorescentes para la conjugación de la cepa donadora con construcción RP4::Ptet::sfgfp con la microbiota humana y los respectivos controles (tanto población donadora como aceptora previas a ser incubadas juntas). Las células positivas para FITC se analizan en segundo canal fluorescente, AmCyan ($\lambda = 510 \pm 50$ nm) para poder diferenciar los TC de bacterias autofluorescentes de la microbiota intestinal. Si la señal es también positiva en AmCyan consideraremos que estamos ante células autofluorescentes, mientras que si la señal es negativa consideraremos que son TC. **(B)** Eficiencia de conjugación para las muestras testadas usando muestra fecal humana cultivada como microbiota aceptora, y las cepas *E. coli* DH5 α Z1 que contienen los plásmidos R388 y RP4 con las construcciones Ptet::sfgfp y Plac::sfgfp como donadoras. La eficiencia fue calculada como número de TC (FITC+; AmCyan -) dividido por el número total de células (singletes). Como control se muestra el plásmido no conjugativo pCN47::Plac::sfgfp testado en las mismas condiciones. Las barras representan la media de los datos de eficiencia de conjugación y las líneas verticales la desviación típica.

Las células transconjugantes (FITC +, AmCyan -) de ambos experimentos fueron separadas por “sorting” y su ADN fue extraído para poder secuenciar el gen 16S rRNA tal y como se ha descrito en los experimentos realizados con ciego de ratón, obteniéndose resultados similares de purificación. También se secuenciaron células no fluorescentes de las muestras de microbiota aceptora (heces cultivadas y sin cultivar) para poder comparar las abundancias de TC con las abundancia de las bacterias que

había en las muestras originales. En la figura R18 se muestra un ejemplo de una de las purificaciones realizadas. Cabe destacar que aunque se observan algunas pocas células fluorescentes en el control (heces), el número es tan reducido que posteriormente no da lugar a un amplificado del gen 16s rRNA tras la extracción del DNA de un número tan bajo de células purificadas.

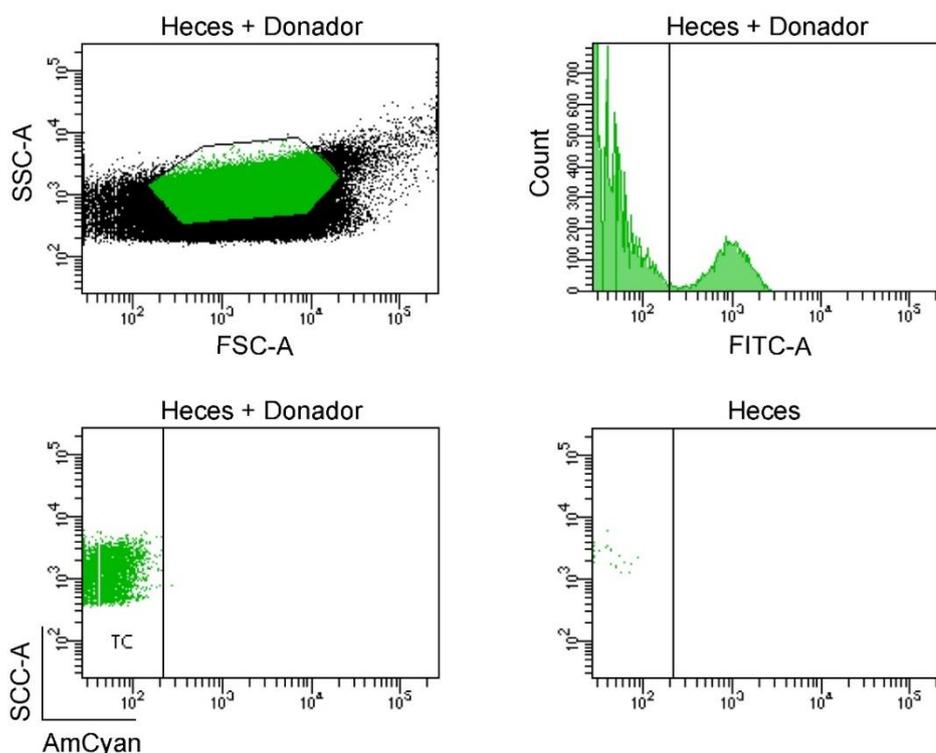


Figura R18. Separación celular de las bacterias fluorescentes detectadas por citometría de flujo para su posterior secuenciación y análisis. Esquema general utilizado para la separación celular de bacterias transconjugantes. En primer lugar se seleccionan los eventos detectados según las características de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) esperados para nuestras células. A continuación se visualizan las bacterias en el canal FITC-A ($\lambda = 530 \pm 30$ nm) para el que esperamos ver señal fluorescente y las células positivas se analizan en un segundo canal fluorescente, AmCyan ($\lambda = 510 \pm 50$ nm). Si la señal es también positiva en AmCyan consideraremos que estamos ante células autofluorescentes, mientras que si la señal es negativa consideraremos que son bacterias TC y serán aisladas en PBS estéril para la extracción de ADN. Como control de la estrategia de gating miramos la fluorescencia en los mismos canales para la microbiota fecal utilizada como población aceptora (Heces).

Por otro lado, es importante indicar que durante el proceso de purificación de células, para algunas conjugaciones no se obtuvieron suficientes células como para hacer posteriormente extracción de ADN. Afortunadamente, tenemos como mínimo una réplica de cada una de las condiciones que queríamos testar (tipo de plásmido, tipo de promotor). Además también obtuvimos, como cabía esperar, suficientes

células no fluorescentes que también se purificaron para ser secuenciadas por amplificación del gen 16s rRNA de microbiota aceptora cultivada o sin cultivar (Tabla R2).

Como control del proceso, además de las células fluorescentes separadas y los cultivos aceptores originales, también se extrajo ADN y se secuenció el PBS que fluye por los conductos del citómetro y que se utiliza en los tubos de recogida de células y el agua del kit de extracción de ADN. Por otro lado, también se secuenció el control negativo de la primera PCR de secuenciación para descartar una posible contaminación. Las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas mediante la plataforma Illumina fueron posteriormente procesadas mediante el paquete de software DADA2 tal y como se ha descrito anteriormente (métodos, 3.17.1).

Las ASVs detectadas en los controles negativos fueron eliminadas del análisis excepto en el caso de que se cumpliera el criterio anteriormente descrito. De esta forma, únicamente se mantuvo en el análisis 1 ASV del género *Enterobacter* que aparecía en los controles negativos. Además, también se eliminaron todas aquellas ASVs pertenecientes al género *Escherichia/Shigella* que tuvieran menos de 3 nucleótidos de diferencia con la secuencia del 16S rRNA de la bacteria donadora tal y como se ha descrito anteriormente.

En las tablas R2 A y B se recogen, tanto para los controles negativos como para las muestras analizadas, los valores del número de secuencias obtenidas iniciales (Inicial), así como el número de secuencias que se mantienen en el análisis tras pasar los parámetro de calidad de DADA2 y eliminar aquellas bacterias que sospechamos podrían ser donadoras con escape de fluorescencia, así como las que aparecían en los controles negativos y podían representar falsos positivos (Final). Al igual que sucedía con los experimentos que utilizaban microbiota cecal murina, el número de secuencias disminuye tras aplicar los filtros mencionados (Final) pero los niveles restantes nos permiten realizar los análisis que se describirán a continuación.

En el caso de los controles negativos, los filtros aplicados nos permiten eliminar todas las secuencias amplificadas o reducir su número a un máximo de 16 secuencias.

Tabla R2. Número de lecturas obtenidas para cada muestra tras la secuenciación del gen 16S rRNA antes y después de aplicar los filtros descritos. (A) Resultado de la secuenciación del gen 16s rRNA de las células fluorescentes aisladas por sorting en los dos experimentos (Exp 1 y 2) tras incubar la microbiota de heces humanas junto con bacterias donadoras con distintas combinaciones de plásmidos (R388 o RP4) y promotor (Ptet o Plac) y el gen de fluorescencia *sfgfp*, así como la secuenciación de la microbiota cultivada (C) o sin cultivar (NC) utilizada como población aceptora (AC). La media de los valores se muestra en la última fila de la tabla. **(B)** Resultado de la secuenciación del PBS usado en el proceso de sorting (PBS), el agua del kit de extracción de ADN (Agua) y los amplificadores del control negativo de la primera reacción de PCR del proceso de secuenciación (1PCR) utilizados como controles del proceso. La media de los valores se muestra en la última fila de la tabla.

A

			Inicial	Final	
TC	Exp. 1	NC	R388::Ptet	1,7x10 ⁵	1,4 x10 ⁵
			RP4::Ptet	1,5 x10 ⁵	1,1 x10 ⁵
		C	R388::Ptet	1,6 x10 ⁵	1,1 x10 ⁵
			RP4::Ptet	1,7 x10 ⁵	8,3 x10 ⁴
			RP4::Plac	1,3 x10 ⁵	1,1 x10 ⁵
	Exp. 2	NC	R388::Ptet	2,2 x10 ⁵	1,4 x10 ⁴
			RP4::Ptet	1,3 x10 ⁵	5,8 x10 ²
		C	R388::Plac	1,7 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
			RP4::Plac	1,6 x10 ⁵	5,0 x10 ³
			RP4::Plac	8,3 x10 ⁴	5,7 x10 ³
AC	Exp. 1	NC	9,7 x10 ⁴	4,4 x10 ⁴	
		C	8,9 x10 ⁴	2,9 x10 ⁴	
	Exp. 2	NC	9,9 x10 ⁴	5,0 x10 ⁴	
		C	1,2 x10 ⁵	9,2 x10 ³	
Media			1,4 x10 ⁵	5,2 x10 ⁴	

B

	Inicial	Final
PBS	4 x10 ⁴	0
Agua	5,5 x10 ⁴	16
1PCR	3,2 x10 ⁴	0
Media	4,2 x10 ⁴	5,3

A partir del número de secuencias que se muestra en la columna “Final” de la tabla R2A, analizamos en primer lugar la estructura global de las poblaciones bacterianas secuenciadas mediante la distancia UniFrac, representada mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Como ya hemos descrito anteriormente, la cercanía de las muestras en el gráfico refleja su similitud en cuanto a composición microbiana. En la figura R19A observamos como la primera coordenada, que explica un 32,16 % de las diferencias encontradas entre los grupos, separa las muestras en función del tipo de muestra que se está analizando, aceptoras o transconjugantes. Esto significa que independientemente de la bacteria donadora utilizada, la composición microbiana de las muestras de TC se parece mucho más entre sí que a la composición de las muestras aceptoras, haya sido o no ésta previamente cultivada. De hecho, esta diferencia entre los dos grupos de muestras es estadísticamente significativa (PERMANOVA, p valor = 0,0016). Para poder estudiar con más profundidad la composición microbiana de las distintas muestras, se clasificaron taxonómicamente las secuencias obtenidas y se representó la abundancia relativa de los taxones predominantes mediante diferentes colores evidenciando principalmente una expansión de las Proteobacterias entre las bacterias TC frente a las muestras de la microbiota aceptora (Figura R19B), como ya había ocurrido con los TC de la microbiota de ratón. Además, el cálculo de la diversidad bacteriana a partir del índice de Shannon a nivel de ASV (métodos, apartado 3.17.1) muestra, al igual que ocurría en los experimentos con microbiota de ratón, una disminución general, en este caso significativa (T-test, p valor = 0,0013), de la diversidad en las muestras de TC en comparación con la de las poblaciones aceptoras (Figura R19C). Estos resultados parecen indicar que la diseminación de los plásmidos estudiados no ocurre por igual en la microbiota intestinal, sino que predomina en el filo Proteobacteria.

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

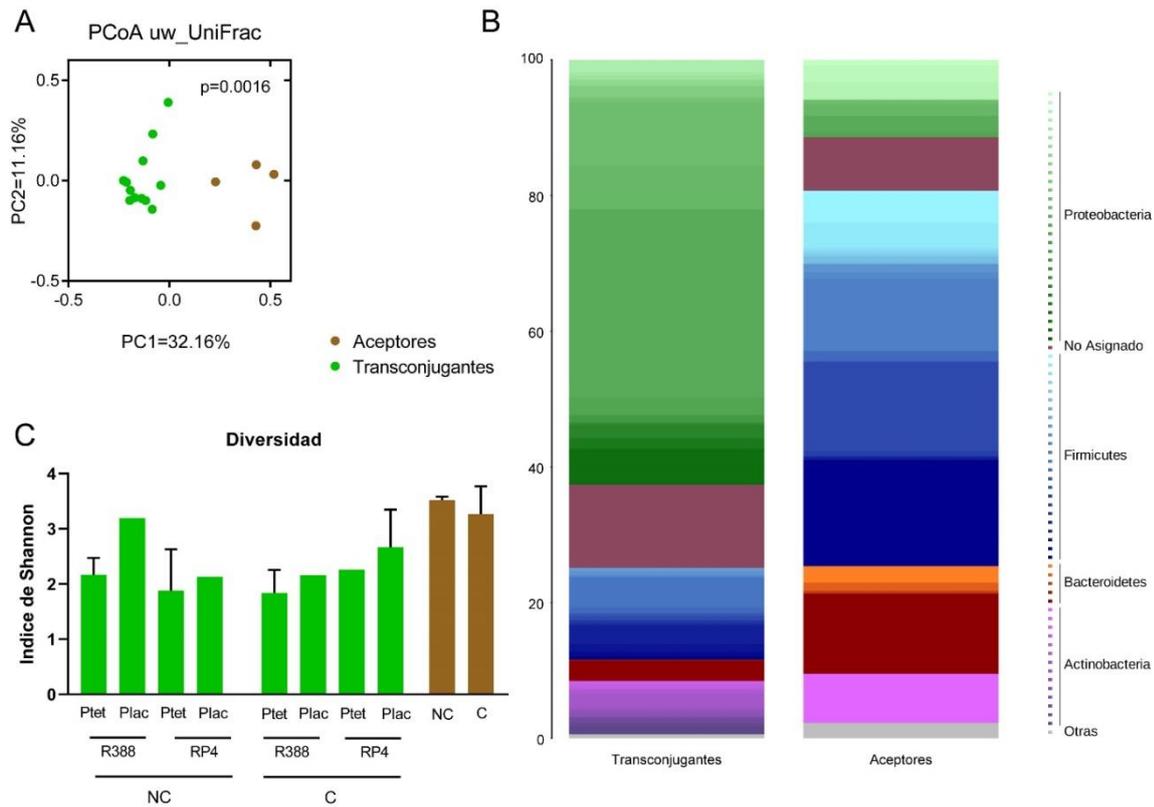


Figura R19. Los análisis globales del gen 16S rRNA indican la existencia de diferencias entre la microbiota humana que se usa como población aceptora y las bacterias que adquieren los plásmidos conjugativos. (A) Análisis de Coordenadas Principales basado en la distancia unweighted UniFrac. Cada punto representa una muestra analizada. Los marrones se corresponden a la microbiota intestinal humana cultivada o sin cultivar (N=4) usada como población aceptora de los plásmidos conjugativos, mientras que los verdes representan las diferentes muestras secuenciadas de TC (N=12) según el tipo de donante testado (R388::Ptet, R388::Plac, RP4::Ptet, RP4::Plac con el gen *sfGFP*). Se muestran las 2 coordenadas principales (PC1 y PC2) que explican la mayor parte de la variabilidad detectada entre las muestras, la cual está indicada en %. El p valor obtenido al aplicar el test PERMANOVA fue $p=0,0016$. **(B)** Clasificación filogenética de las secuencias del gen 16S rRNA. Las barras representan la composición de la microbiota del conjunto de muestras clasificadas como transconjugantes (células FITC+, AmCyan- aisladas por sorting; N=12) o comoceptoras (microbiota humana; N=4). La abundancia relativa de los taxones predominantes obtenidos por clasificación de las secuencias del gen 16S rRNA se muestran con diferentes colores, a la derecha los hemos agrupado en un función del filo al que pertenecen. **(C)** Diversidad microbiana medida mediante el índice de Shannon. Cada barra corresponde a un tipo de muestra analizada. En verde se representan las muestras transconjugantes (con las diferentes combinaciones de promotor (Ptet o Plac) y plásmidos (R388 o RP4) testados, y en marrón las muestras correspondientes a la microbiota humana bien cultivada (C) o sin cultivar (NC) usada como aceptora en los experimentos. Para las muestras de las que disponemos de dos réplicas, la barra representa la media y las líneas verticales la desviación típica.

Para estudiar en más profundidad la diseminación de los plásmidos conjugativos, hicimos un análisis de los distintos taxones de la microbiota en los que

detectamos TC y se representaron los porcentajes de TC para cada nivel taxonómico con respecto al total detectados por secuenciación del 16S rRNA. Como vemos en la figura R20, si agrupamos los TC detectados de cada uno de los plásmidos, el comportamiento que siguen en cuanto a transferencia parece ser bastante similar. A pesar de las diferencias que se observan a nivel de orden (62,5% para R388 y 50% para RP4) y a nivel de familia (49,3% para R388 frente al 26,7% del RP4), ambos plásmidos se transfieren al 70% de los filios y en torno al 35% de los géneros detectados. Sin embargo, las diferencias son mucho mayores si agrupamos las muestras en función del promotor presente en la construcción (Ptet o Plac) o de la microbiota aceptora utilizada (cultivada o no cultivada). En el primero de los casos, encontramos una representación mayor en todos los taxones, llegando a doblar los porcentajes para muchos de ellos, de los TC con el promotor Plac (48,5% de los géneros, 66,7% de las familias, 70% de los órdenes, 78,3% de las clases y 80% de los filios) frente al promotor Ptet (23,2% de los géneros, 23,3% de las familias, 37,5% de los órdenes, 39,1% de las clases y 40% de los filios). Los datos sugieren que existe una mayor facilidad para expresar por una mayor diversidad de bacterias las construcciones con el promotor Plac que con el promotor Ptet. De hecho, las diferencias entre ambos tipos de promotores respecto a la diversidad bacteriana detectada de TC es significativa teniendo en cuenta el % de taxones detectados de manera individual en cada muestra (T-test, p valor < 0.05). Estas diferencias significativas se observaron para todos los niveles taxonómicos cuando comparamos el grupo de muestras Ptet vs el grupo Plac. En el caso de comparar la diseminación a la microbiota cultivada frente a la no cultivada, observamos una disminución de alrededor del 10% en el número de TC encontrados en todos los niveles filogenéticos al cultivar la microbiota que actúa como población aceptora, aunque esta diferencia no es significativa cuando se tiene en cuenta la variabilidad observada entre muestras dentro de un mismo grupo.

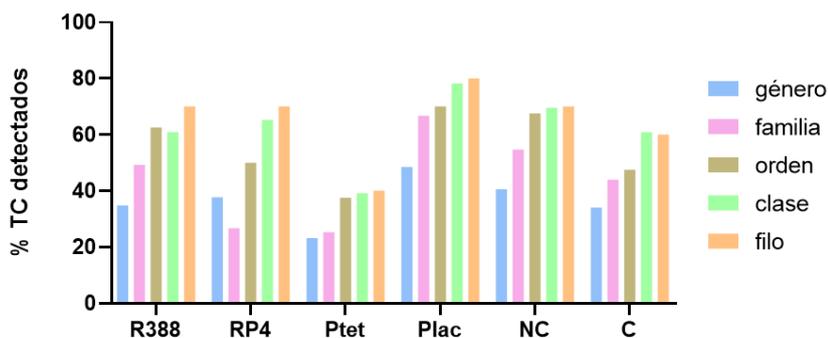


Figura R20. Porcentaje de TC detectados para cada uno de los niveles filogenéticos estudiados. El gráfico representa el porcentaje de géneros, familias, órdenes, clases y filos bacterianos diferentes detectados cuando agrupamos las muestras que contienen bacterias TC en función del plásmido adquirido (R388 o RP4), del promotor presente en la construcción (Ptet o Plac) o del tipo de microbiota usada como aceptora (cultivada (C) o no cultivada (NC)) con respecto al total de ese taxón detectado por secuenciación del gen 16S rRNA. N de los grupos: R388=6, RP4=6, Ptet=7, Plac=5, NC=6, C=6.

Al igual que ocurría con los experimentos realizados con microbiota murina, y como se puede observar en el Heatmap (Figura R21), se detectan TC en los filos más abundantes de la microbiota (Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria) además de en otros menos abundantes (Fusobacteria). Además, encontramos TC en todas las clases más abundantes dentro de los filos ya descritos (Clostridia, Bacilli, Bacteroidia, Actinobacteria, Alpha, Beta y Gammaproteobacteria). Centrándonos en el nivel de género, la secuenciación del gen 16S rRNA bacteriano fue capaz de detectar 138 géneros diferentes en el total de las muestras analizadas de los cuales 82 (59,4%) están presentes en alguna de las muestras de TC y en 26 (18,8%) de ellos se ha podido verificar el evento de conjugación en más de una ocasión. El 35,4% (29 géneros) de los géneros en los que se detectan TC también están presentes en alguna de las muestras aceptoras (ej. *Escherichia/Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, etc, (Anexos, Tabla A2A y A2B), mientras que el 64.6% restante (53 géneros), no aparecen en la microbiota humana aceptora (ej. *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pelomonas*, *Sphingomonas*, etc.) probablemente debido a su baja abundancia, lo que sugiere que son géneros bacterianos especialmente eficaces para la captación de los plásmidos conjugativos que estamos estudiando, ya que hemos detectado TC a pesar de que dichos géneros se encuentran con una abundancia inferior al umbral de detección en la microbiota aceptora. Por otro lado, podemos apreciar diferencias claras al comparar los

resultados de los dos experimentos realizados especialmente en relación con los filos Actinobacteria y Proteobacteria. En las muestras TC del “Experimento 1” no se detectaba ninguna bacteria del filo Actinobacteria, sin embargo, llama la atención la detección en el 100% de las muestras de bacterias de la clase Gammaproteobacteria, concretamente a distintos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella* y *Raoultella*, (Anexos, Tabla A2A) en las muestras de TC y en la microbiota aceptora cultivada. Estas bacterias frecuentemente colonizan el intestino de pacientes hospitalizados y pueden producir infecciones graves en los mismos. Por el contrario, en el “Experimento 2”, se detectan varios géneros de Actinobacterias que han sido capaces de captar alguno de los plásmidos conjugativos, pero siempre con el promotor Plac. Curiosamente, en las muestras de este experimento el único género que se detecta de la familia *Enterobacteriaceae* anteriormente citados es *Escherichia/Shigella* y, en este caso, exclusivamente para la adquisición del plásmido R388 (Anexos, Tabla A2B). Cabe destacar que las muestras de microbiota aceptora del primer y segundo experimento pertenecen al mismo voluntario pero fueron recogidas en días distintos por lo que puede haber ligeros cambios entre ellas (Figura R21 y Anexos, Tablas A2A y A2B).

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

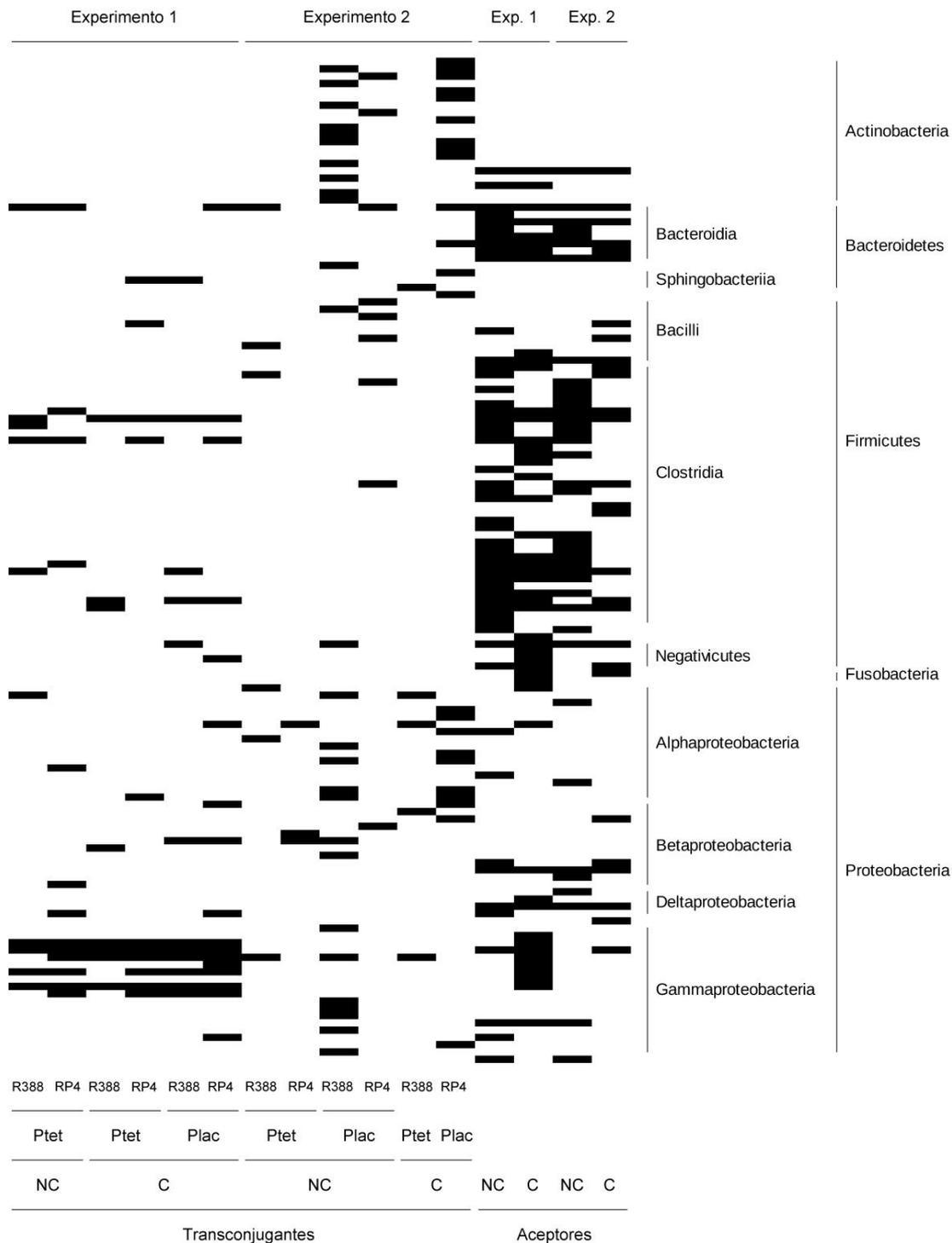


Figura R21. Los plásmidos conjugativos se transfieren a una gran diversidad de bacterias de la microbiota intestinal humana. Análisis por secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las células fluorescentes purificadas (FITC+; AmCyan -), así como de la muestra de heces original (NC) y de la muestra cultivada (C) para los dos experimentos realizados (Experimento 1 y 2). El Heatmap indica presencia (negro) o ausencia (blanco) de los géneros bacterianos detectados en alguno de los dos experimentos. Se indican los plásmidos conjugativos utilizados con distintas combinaciones de plásmido (R388 o RP4) y promotor (Ptet o Plac). A la derecha se indica la clase y el filo bacteriano al que pertenecen dichos géneros.

Posteriormente, se realizó un análisis de la composición del microbioma (ANCOM) para identificar taxones cuya abundancia fuera significativamente distinta entre el grupo de muestras aceptoras y el grupo de muestras TC. Este análisis estadístico no pudimos realizarlo con los datos de los experimentos con microbiota de ratón por el bajo número de muestras aceptoras existentes. En el caso del estudio de diseminación a la microbiota humana, aparecieron dos filos significativamente más representados en las muestras de la microbiota aceptora que en los transconjugantes: Bacteroidetes y Firmicutes ($p < 0,05$; $q < 0,1$). Además, se podía apreciar una tendencia inversa en el caso del filo Proteobacteria, con una sobre-representación en las muestras transconjugantes pero que no era estadísticamente significativa probablemente debido a la variabilidad existente entre los dos experimentos realizados. Los géneros en los que pudimos encontrar diferencias pertenecían, como era de esperar, a los dos filos mencionados, 6 géneros del filo Firmicutes: *Butyrivibrio*, *Phascolarctobacterium*, *Pseudoflavonifractor*, *Faecalibacterium*, *Flavonifractor* y *Clostridium_XIVa*; y 2 géneros del filo Bacteroidetes: *Bacteroides* y *Parabacteroides*. Todos estos géneros detectados tienen una mayor representación en la microbiota aceptora que en las muestras transconjugantes lo cual sugiere que son bacterias a las que el plásmido conjugativo no se transfiere de manera eficiente o que a pesar de transferirse de manera eficiente, la abundancia de dicha bacteria es significativamente mayor en las muestras aceptoras que no en los TC. Cabe destacar que no se detectó una mayor abundancia significativa en ninguno de los géneros en las muestras de los TC, lo cual podría ser debido a la variabilidad de los TC dependiendo del experimento, plásmido y promotor utilizado (Figura R21, Anexos, Tablas A2A y A2B).

A pesar de esta gran variabilidad entre las muestras que no nos permitió identificar géneros bacterianos cuya abundancia era significativamente mayor en las poblaciones bacterianas de TC, sí que pudimos identificar ciertos géneros bacterianos que adquieren los plásmidos conjugativos con mayor facilidad. Consideraremos relevantes aquellos géneros bacterianos para los que observamos TC en más del 33% de las conjugaciones realizadas, como hemos explicado anteriormente (en este caso sería detectar ese género en al menos 5 de las 12 conjugaciones realizadas). En el caso de la microbiota intestinal humana, encontramos 10 géneros que cumplen este

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

requisito (Figura R22): 7 de ellos pertenecen al filo Proteobacteria, 1 a la clase Betaproteobacteria (*Pelomonas*) y 6 a la familia *Enterobacteriaceae* dentro de la clase Gammaproteobacteria (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Raoultella* y *Salmonella*); 2 géneros a la clase Clostridia dentro de Firmicutes (*Clostridium XIVa* y *Dorea*) y un género del filo Bacteroidetes (*Bacteroides*). El hecho de que muchos de estos géneros, como ya hemos ido comentando, puedan producir infecciones graves en pacientes hospitalizados hace que sea especialmente relevante su predisposición a captar plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos que puedan dificultar su tratamiento.

			TODOS (12)	R388 (6)	RP4 (6)	Ptet (7)	Plac (5)	NC (6)	C (6)
Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Bacteroides</i>	50	33	67	43	60	67	33
Firmicutes	Clostridia	<i>Clostridium XIVa</i>	42	50	33	43	40	17	67
		<i>Dorea</i>	33	17	50	43	20	33	33
	Betaproteobacteria	<i>Pelomonas</i>	33	33	33	14	60	33	33
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Citrobacter</i>	50	50	50	57	40	33	67
		<i>Enterobacter</i>	50	50	50	57	40	33	67
		<i>Escherichia/Shigella</i>	67	83	50	71	60	50	83
		<i>Klebsiella</i>	42	33	50	43	40	33	50
		<i>Raoultella</i>	50	50	50	57	40	33	67
		<i>Salmonella</i>	33	17	50	29	40	17	50

Figura R22. Representación de los géneros bacterianos de la microbiota intestinal humana con mayor eficiencia en la adquisición de plásmidos conjugativos. Representación de la frecuencia de detección de TC en los géneros microbianos detectados por secuenciación del gen 16S rRNA. Solo se muestran aquellos géneros de los que se pudieron detectar TC en al menos el 33% del total de las conjugaciones realizadas. Las conjugaciones realizadas se han agrupado en función del plásmido conjugativo (R388 o RP4), del promotor de la construcción (Ptet o Plac) o del tipo de microbiota utilizada como aceptora (no cultivada (NC) o cultivada (N)). La primera columna (TODOS) recoge los resultados globales del total de conjugaciones realizadas. El número entre paréntesis indica el tamaño muestral de cada grupo (i.e. conjugaciones realizadas). El número dentro de las cajas de colores indica el % de las conjugaciones realizadas de ese tipo donde se detectó un TC de ese género. El color es indicativo de dicho %, cuanto más intenso mayor es el %.

A diferencia de lo que ocurría con la microbiota murina, en la humana no encontramos ningún género para el que el que se hayan encontrado TC en el total de las muestras. El género que a nivel global está más representado es *Escherichia/Shigella* lo que no es de extrañar teniendo en cuenta que la bacteria donadora es *E. coli* y aunque se trate de plásmidos de amplio espectro se transferirán con mayor facilidad entre especies filogenéticamente relacionadas. En esta misma línea encontraríamos todas las enterobacterias, cuya frecuencia de captación de

plásmidos aumenta en el caso de utilizar como población aceptora la microbiota intestinal cultivada (Figura R22). Probablemente esto se deba a que, durante el cultivo, estos géneros bacterianos son capaces de expandir y se encuentran más representados en el momento de la conjugación (media de Enterobacteriaceae en cultivada = 11,7%; media en no cultivada: 0,011%).

Sin embargo, cabe destacar que detectamos transferencia de los plásmidos conjugativos no solamente entre enterobacterias, como cabría esperar por la proximidad filogenética con la bacteria donadora, sino que la metodología desarrollada nos permitió detectar transferencia a otro tipo de filos filogenéticamente muy distantes como es el caso de Firmicutes y Bacteroidetes. De hecho, entre los géneros bacterianos que más frecuentemente adquirieron los plásmidos conjugativos en la microbiota humana encontramos los géneros *Bacteroides* (filo Bacteroidetes), *Dorea*, y *Clostridium XlVa* (Filo Firmicutes). Dichos géneros son frecuentemente identificados en la microbiota intestinal humana (13,14). Con respecto al género *Bacteroides*, cabe destacar que aparecía también como uno de los géneros más relevantes en la captación de plásmidos por la microbiota murina. *Bacteroides*, *Pelomonas* y *Escherichia/Shigella* son los 3 únicos géneros que aparecen como compartidos entre los géneros que mayor eficiencia tienen de adquisición plasmídica tanto a la microbiota humana como a la de ratón, reafirmando su posible importancia en la diseminación de resistencias a antibióticos mediante plásmidos conjugativos.

4.1.5. Diseminación de los plásmidos conjugativos en un modelo *in vivo*

Posteriormente decidimos utilizar la estrategia de detección de TC mediante citometría de flujo con el fin de dilucidar mejor el proceso de diseminación de EGM en la microbiota *in vivo*. Para ello se diseñaron diferentes modelos de ratón que se han explicado en el apartado 3.13.1. de Material y Métodos.

Inicialmente y con el objetivo de posibilitar la diseminación del plásmido a la mayor diversidad bacteriana posible, se intentó inocular con la bacteria donadora a ratones con una microbiota intacta, sin modificar mediante antibióticos. En un primer

momento se realizó la inoculación mediante sonda nasogástrica con 10^6 UFCs/ml de la bacteria donadora portadora de la construcción RP4::Ptet::sfgfp (CU585) (métodos, Figura M12A), ya que en los experimentos *ex vivo* tanto con microbiota intestinal murina como humana, se obtuvo una mayor eficiencia de conjugación con este plásmido que con el R388 (mayor número de TC por número total de células). Sin embargo, no se observó colonización de las bacterias donadoras en estas condiciones; es decir, no se detectó ninguna UFC en placas de LB + kan, antibiótico al que confiere resistencia el plásmido conjugativo, 2 días después de la inoculación. Esto probablemente se deba a la resistencia natural a la colonización que ofrece la microbiota intestinal intacta de los ratones sanos. Por ello, decidimos administrar la bacteria en elevada concentración (10^8 UFCs/ml) y de forma continua en el agua de bebida de los ratones (métodos, Figura M12B), basándonos en el protocolo del artículo de Kommineni y colaboradores (94) en el que, mediante esta técnica, conseguían detectar colonización por *Enterococcus faecalis* en ratones que presentan una microbiota intacta.

Con este nuevo modelo, a diferencia del anterior, los niveles detectados en heces para las cepas administradas (*E. coli* DH5 α Z1 como control y *E. coli* DH5 α Z1/RP4::Ptet::sfgfp (CU585)) se mantienen elevados en el tiempo (i.e. 10^6 UFCs/10mg de materia fecal) mientras dura la administración de bacteria en el agua de bebida (Figura R23A). Sin embargo, mediante citometría de flujo no conseguimos observar células fluorescentes y por lo tanto TC en las muestras de heces recogidas a los 2, 4 y 7 días de comenzar la administración de la bacteria donadora en el agua de bebida (resultado no mostrado). Es posible que esto se deba a que los donantes observados en heces podrían representar simplemente un flujo de bacterias que pasan de forma transitoria por el intestino, pero no llegan a colonizarlo debido a la presencia de una microbiota intacta, lo que impediría el contacto de las células donadoras con posibles receptoras y, por tanto, el fenómeno de conjugación bacteriana.

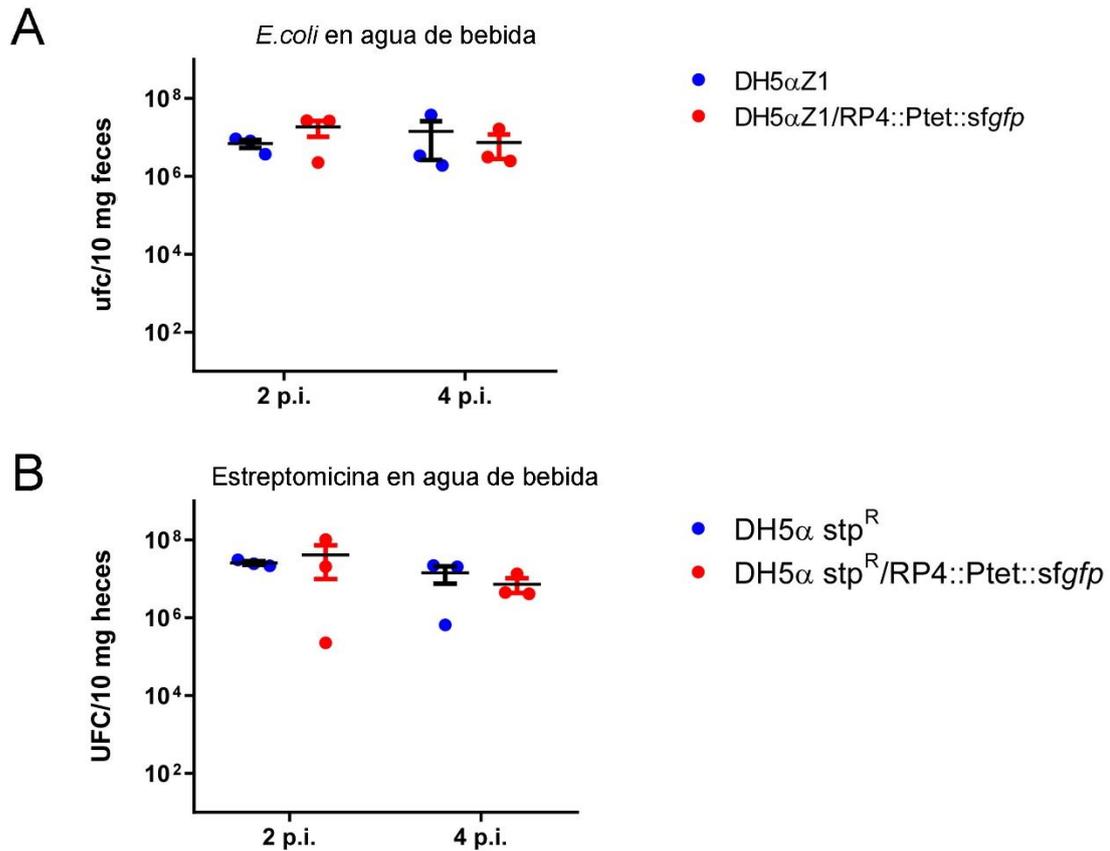


Figura R23. Niveles de la bacteria donadora detectados por cultivo en medio selectivo de las heces recogidas de los ratones. (A) Ratones sin tratar con antibiótico reciben de forma continua 5×10^8 bacterias/ml en el agua de bebida (*E. coli* DH5 α Z1 y *E. coli* DH5 α Z1/RP4::Ptet::sfgfp). Se recogen heces a los 2 y 4 días de estar recibiendo la bacteria y se plaquean en LB + kan. **(B)** Los ratones reciben 5 gr/l de stp de forma continua en el agua de bebida. Tras 3 días de antibiótico son inoculados con 10^6 UFCs de la bacteria donadora (*E. coli* DH5 α stp^R y *E. coli* DH5 α stp^R/RP4::Ptet::sfgfp) mediante sonda nasogástrica. Se recogen heces a los 2 y 4 días post inoculación y se cultivan en placas de LB agar con stp para contar las colonias. Los valores reflejan el número de UFCs en 10 mg de materia fecal. Las líneas horizontales representan la media y +/- el error estándar de la media (SEM). N= 3 ratones por grupo.

Por este motivo, y para favorecer la colonización de la célula donadora, utilizamos un modelo en el que se inocula a los ratones con una dosis de 10^6 UFCs de bacteria tras 3 días de tratamiento con estreptomicina (métodos, Figura M12C), de modo que la perturbación de la microbiota generada por el fármaco abra un nicho disponible a nuestra bacteria para asentarse en el intestino. Para ello es necesario que la bacteria donadora sea resistente a estreptomicina (stp^R), el antibiótico que se administra a los ratones vía oral. Por ello testamos la capacidad de colonización de una cepa de *E. coli* stp^R (CU193) obtenida en nuestro laboratorio, así como su capacidad de colonización tras introducirle el plásmido conjugativo RP4::Ptet::sfgfp (Figura R23B).

Tras el tratamiento con *stp*, detectamos colonización en heces tanto de la cepa de *E. coli* DH5 α *stp*^R como de *E. coli* DH5 α *stp*^R/ RP4::Ptet::*sfgfp*. Una vez corroborado que la cepa con el plásmido conjugativo era capaz de colonizar el intestino de ratones, se obtuvo la cepa DH5 α Z1*stp*^R (CU719, con el represor de Ptet en su genoma y resistente a estreptomicina). Posteriormente se le introdujo el plásmido conjugativo RP4::Ptet::*sfgfp* (CU720) y se diseñaron un par de modelos animales que permitían la recuperación de la microbiota intestinal durante dos semanas tras el cese de tratamiento antibiótico (métodos, Figura M12D y E). En el modelo E, además, se realiza un trasplante fecal (TF) con microbiota de ratón para favorecer la recuperación bacteriana de la microbiota tras el tratamiento antibiótico. Con estos modelos pretendíamos: (i) estudiar EGM durante el tratamiento con estreptomicina, (ii) estudiar EGM tras parar el tratamiento antibiótico, ya que estudios tanto de nuestro grupo como de otros grupos de investigación han demostrado que la microbiota de ratones tratados con antibióticos se recupera parcialmente y (iii) estudiar EGM en el contexto de un trasplante fecal con el fin de permitir una mejor recuperación de la microbiota tras el tratamiento antibiótico. Para ello, se trataron ratones con *stp*, al tercer día de tratamiento se inocularon con la cepa donadora DH5 α Z1 *stp*^R/RP4::Ptet::*sfgfp* (CU720) y 4 días tras la inoculación se detuvo el tratamiento antibiótico (métodos, Figura M12D y E). Con el objetivo de favorecer la transmisión a la mayor diversidad de bacterias posibles, en el modelo E se trató de restaurar la microbiota tras el tratamiento antibiótico mediante un trasplante fecal con bacterias procedentes de heces de ratón control que no ha recibido antibióticos (TFR) y que se administraron vía oral. Por último, 2 semanas tras la inoculación intentamos expandir la población de TC, con el fin de facilitar su detección por citometría de flujo, tratando con antibióticos para los cuales las bacterias portadoras del plásmido conjugativo son resistentes (i.e. ampicilina y kanamicina). Durante todo el experimento se tomaron muestras de heces para analizar los niveles de células donadoras mediante cultivo en medio selectivo y detectar los TC mediante citometría de flujo.

Desafortunadamente, no fuimos capaces de detectar TC por citometría de flujo en ninguna de las muestras de heces (resultado no mostrado). A pesar de este

resultado negativo, los resultados por cultivo en medio selectivo de la bacteria donadora (Figura R24) nos aportaron la siguiente información:

- Durante el tratamiento antibiótico y dos días tras parar el tratamiento se observan los niveles más altos de colonización de la célula donadora. A partir del tercer día de parar el tratamiento antibiótico (7 p.i.) se observa una disminución de los niveles de la bacteria donadora.
- El TFR favorece la disminución de los niveles de bacteria donadora inicialmente, pero no es capaz de eliminarla por completo. Resultado distinto al obtenido por nuestro grupo con al inocular *Enterococcus* en lugar de *E. coli*, donde el trasplante fecal es capaz de eliminar por completo el *Enterococcus* (20).
- Tras dos semanas de recuperación desde el final del tratamiento antibiótico, los niveles de la bacteria donadora se estabilizan y se igualan entre aquellos ratones que han recibido TF y los que no lo han recibido.
- El segundo tratamiento con antibiótico, administrado para favorecer la expansión de bacterias que contengan el plásmido conjugativo no favorece la expansión de la bacteria donadora.

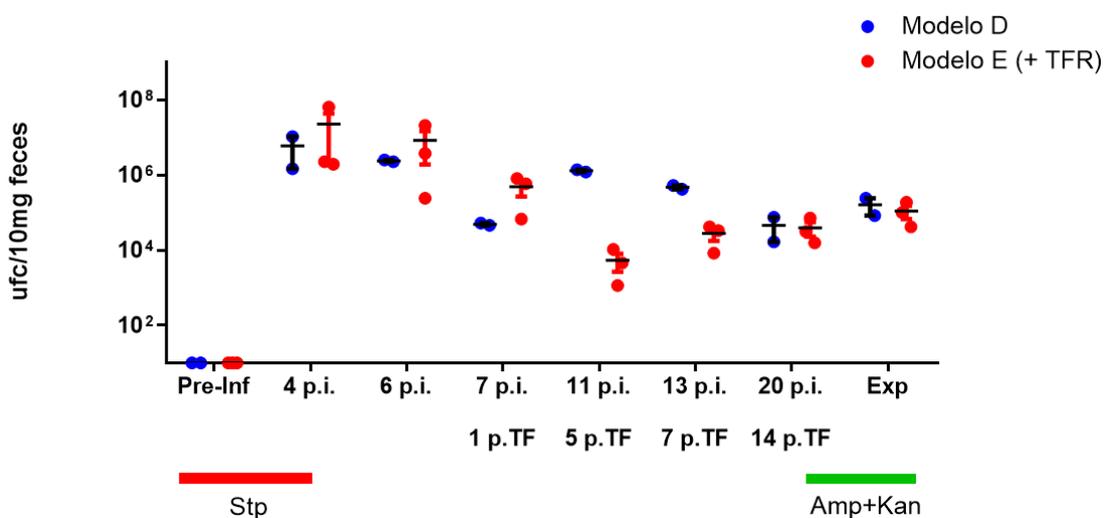


Figura R24: Nivel de colonización de la bacteria donadora en los modelos de ratón D y E. Los ratones fueron tratados con estreptomicina durante 1 semana. A los 3 días de tratamiento se inocularon mediante sonda nasogástrica con 10⁶ UFCs de bacteria donadora resistente a estreptomicina DH5 α Z1 stp^R/RP4::Ptet::sf gfp . 4 días tras la inoculación (4p.i) se para el tratamiento antibiótico. Los días 6 y 7 post inoculación se administra un trasplante fecal (TF),

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

usando microbiota de ratón no tratado, a los animales del modelo E con el objetivo de ayudar a restaurar su microbiota intestinal tras el tratamiento con stp. Los días 20 y 21 post inoculación, que para el modelo E se corresponde con 14 y 15 días tras el inicio del TF, se administra un tratamiento antibiótico de amp + kan mediante sonda nasogástrica a todos los ratones. Este tratamiento eliminará del intestino aquellas bacterias que no sean resistentes a los antibióticos, por lo que en teoría permitirá que la población de bacterias portadoras de plásmido conjugativo (donantes y TC) puedan expandir. Las heces recogidas durante el experimento se cultivan en LB + stp para contar el número de bacterias donadoras. Las heces de los ratones antes de ser inoculados con la bacteria donadora fueron crecidas en LB + stp y no se detectaron colonias. Los valores de la figura reflejan el número de UFC en 10 mg de materia fecal. Las líneas horizontales representan la media y +/- SEM.

Teniendo en consideración los resultados obtenidos en el experimento anterior, se diseñó un nuevo modelo experimental (métodos, Figura M12F) en el que se realizaron las siguientes modificaciones:

- (i) Se realizó un trasplante fecal con microbiota humana fresca (TFH) en lugar de con la microbiota del ratón. Dicho cambio se realizó teniendo en cuenta los resultados *ex vivo* en los que observamos TC utilizando la muestra fresca de heces humana sin cultivar, pero no con la muestra sin cultivar de ratón.
- (ii) En lugar de esperar 2 semanas para promover la expansión de células que hayan captado el plásmido mediante un segundo tratamiento antibiótico con amp + kan, dicha expansión se realizó inmediatamente tras el TFH.
- (iii) En este modelo infectamos la mitad de los ratones con una cepa bacteriana sin plásmido conjugativo, como control, y fuimos sacrificando ratones de manera temporal para analizar también los niveles de TC en ciego y colon.

Los resultados por plaqueo muestran nuevamente que el día 4 post inoculación es el momento en el que encontramos mayores niveles de la bacteria donadora en el intestino de ratón (Figura R25A). Estos niveles descienden ligeramente cuando se elimina el tratamiento antibiótico y se restaura la microbiota con TFH, pero siguen siendo detectables alrededor de 10^6 UFCs/10mg de heces. Tras la expansión de células que contienen el plásmido, realizada con el segundo tratamiento antibiótico, detectamos un aumento significativo de los niveles de bacterias resistentes al antibiótico en uno de los ratones que había sido infectado con la cepa que contiene el plásmido conjugativo (Figura R25A). Posteriormente analizamos la fluorescencia de las

bacterias de las heces recogidas por citometría. Cabe destacar que en la muestra donde se observó expansión de bacterias resistentes al segundo antibiótico, también se detectaron células fluorescentes, sugiriendo que el plásmido conjugativo se había transferido a bacterias de la microbiota intestinal (Figura R25B). Actualmente estamos a la espera de la separación celular, extracción del ADN y análisis del 16S rRNA para identificar a qué bacterias de la microbiota se ha transmitido el plásmido conjugativo.

En la figura R25C se muestran las ventanas de citometría para los 4 ratones que se mantuvieron vivos hasta el final del experimento, dos de ellos infectados con bacteria sin plásmido y los otros dos con la cepa donadora de plásmido RP4::Ptet::sfgfp. Como se puede apreciar, únicamente se observó población de células fluorescentes (FITC+; AmCyan -) en uno de los ratones que presentaba la cepa con el plásmido conjugativo. Dicha población de células ya es visible el mismo día de la administración del segundo antibiótico y aumenta al día siguiente de la administración del segundo antibiótico (el cual favorece la expansión de bacterias que presentan el plásmido conjugativo). Resultados similares fueron obtenidos cuando se analizaron las muestras de ciego y colon (datos no mostrados). Cabe destacar que no se observó ninguna célula fluorescente (FITC+; AmCyan -) en ninguno de los ratones que fueron colonizados con la cepa que no contenía el plásmido conjugativo.

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

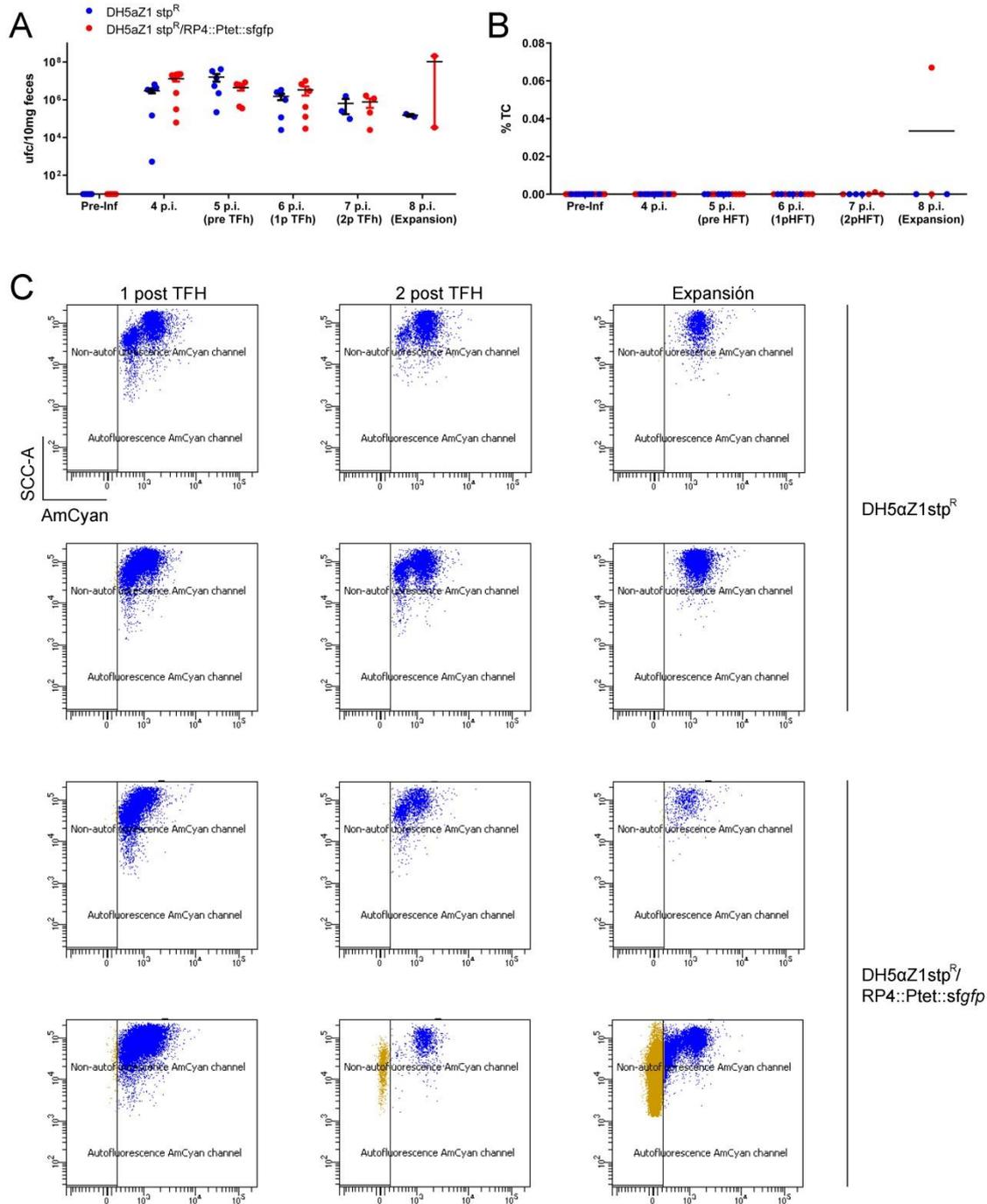


Figura R25. Detección TC *in vivo*. Resultados del experimento *in vivo* utilizando TFH. Los ratones fueron tratados con *stp* 5 g/L, al tercer día de tratamiento fueron inoculados mediante sonda nasogástrica con 10⁶ UFCs de la cepa donadora. La mitad de los ratones (n=8) fueron inoculados con la cepa DH5αZ1 *stp*^R sin plásmido conjugativo (CU719), como control, y la otra mitad con la cepa donadora DH5αZ1 *stp*^R/RP4::Ptet::*sfgfp* (CU720). A los 4 días post inoculación se detuvo el tratamiento antibiótico. Posteriormente, se administraron a todos los ratones dos dosis en días consecutivos de TFH a partir de materia fecal humano recién obtenido y se inició la expansión de portadores de plásmido mediante la administración de kan + amp. Se recogieron heces a diario para cultivar en placas de LB agar con kan y para visualizar por citometría de flujo. Además, los ratones se sacrificaron de manera progresiva durante el

experimento para analizar también ciego y colon con el mismo procedimiento que las heces. **(A)** Número de UFCs por cada 10 mg de heces obtenidas tras cultivar en medio LB + kan. **(B)** Porcentaje de células TC visualizadas por citometría de flujo. **(C)** Visualización por citometría de flujo de las heces recogidas para los 4 ratones que llegaron al último día del experimento (el resto fueron sacrificados en días anteriores para analizar TC en ciego y colon). Las dos primeras filas corresponden a ratones inoculados con DH5 α Z1 stp^R sin plásmido conjugativo mientras que las otras dos son los resultados de los 2 ratones inoculados con DH5 α Z1 stp^R/RP4::Ptet::sf gfp . Se indican en la figura los posibles TC en color amarillo (FITC+; AmCyan -).

Los resultados obtenidos con este modelo de ratón sugieren que *in vivo* existe transferencia del plásmido conjugativo tras realizar el TFH. Dicha transferencia se apreció exclusivamente en uno de los ratones analizados y principalmente el día tras la administración del antibiótico que promueve la expansión de bacterias que contengan el plásmido conjugativo. Cabe destacar que el experimento comenzó con 8 ratones por grupo, pero fueron sacrificados de manera progresiva a lo largo del experimento para analizar también lo que ocurría en su microbiota tanto de ciego como de colon, por lo que el tamaño muestral al final del experimento quedó reducido a 2 ratones por grupo. Por ello debemos repetir el experimento con un mayor número de ratones y analizar la microbiota de todos ellos para poder saber si existen ciertas composiciones de la microbiota intestinal que favorecerían la diseminación de los EGM que estamos estudiando.

Los resultados obtenidos en este último experimento muestran que la técnica desarrollada nos permite visualizar TC *in vivo* en las condiciones anaeróbicas del intestino. Además, al utilizar TFH para restaurar la microbiota eliminada tras el tratamiento antibiótico, podemos mimetizar exactamente lo que ocurre en pacientes hospitalizados que reciben TFH para restaurar su microbiota tras la detención del tratamiento antibiótico. Sin embargo, experimentos adicionales son necesarios para confirmar los resultados obtenidos, ya que exclusivamente fuimos capaces de detectar posibles TC en uno de los ratones analizados.

4.2. Estudio de la evolución *in vivo* a corto plazo aislados clínicos multirresistentes.

Las bacterias multirresistentes, y más concretamente las enterobacterias, se han convertido en las últimas décadas en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial (25). Estas bacterias oportunistas son capaces de colonizar y expandir en el intestino de pacientes con una microbiota intestinal alterada. Cuando alcanzan altos niveles de colonización intestinal, pueden pasar a sangre desde donde son capaces de diseminar a diversos órganos causando infecciones o incluso la muerte del paciente (3). La capacidad de adaptación y evolución continua de estas bacterias queda patente al observar la velocidad con la que adquieren genes de resistencia a antibióticos que obligan a utilizar fármacos alternativos en los pacientes infectados, que suelen tener una menor efectividad además de presentar mayores costes y toxicidad. En este trabajo se pretende estudiar *in vivo* fenómenos de TGH que puedan contribuir a la evolución a corto plazo de enterobacterias multirresistentes (EMR) centrándonos especialmente en la adquisición de nuevas resistencias a antibióticos a través de la captación de EGM aplicando la tecnología de secuenciación de genomas completos.

4.2.1. Selección, recogida y caracterización de las enterobacterias multirresistentes.

El modelo humano con el que trabajamos lo constituyen muestras fecales de pacientes con leucemia aguda ingresados en el Hospital La Fe de Valencia que reciben ciprofloxacina como tratamiento profiláctico acompañado en ocasiones de otros antibióticos en función de la necesidad de cada paciente. Las características de inmunosupresión y tratamiento con antibiótico convierten a estos pacientes en especialmente susceptibles a las infecciones por patógenos oportunistas, incluyendo EMR.

Se recogieron semanalmente muestras perianales de los pacientes hospitalizados con leucemia aguda que eran sembradas en medios de cultivo cromogénicos selectivos para la detección de enterobacterias y fermentadores gram negativos multirresistentes. La identificación de las colonias detectadas era

comprobada mediante espectrometría de masas MALDITOF. Para cada aislado detectado, se analizó mediante Vitek y disco-difusión su sensibilidad o resistencia para los principales antibióticos que se utilizan en la clínica obteniendo así su patrón de resistencia o antibiograma, de acuerdo con la Guía de Estándares Clínicos y de Laboratorio (2016). Los antibióticos testados fueron: ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, aztreonam, ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem, cefoxitina, cefuroxima, ceftazidima, ceftriaxona, amikacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina, cotrimoxazol y colistina. Los aislados fueron considerados multirresistentes de acuerdo con la definición establecida por Magiorakos y colaboradores (15) cuando no eran susceptibles a al menos un agente en 3 o más categorías antimicrobianas sin tener en cuenta aquellos para los que la bacteria es intrínsecamente resistente.

De las muestras recogidas, se seleccionaron para el estudio de la evolución a corto plazo de las EMR las cepas que hubiesen sido identificadas en varias muestras consecutivas del mismo paciente y que hubiesen adquirido nuevas resistencias (cambio en el antibiograma de Sensible a Resistente) en alguno de los antibióticos testados en un plazo máximo de dos semanas entre el primer y segundo aislado. De esta forma se seleccionaron un total de 52 muestras provenientes de 26 pacientes de forma emparejada, previa y posterior al cambio en el perfil de sensibilidad. Para cada pareja tendremos un aislado multirresistente inicial y un segundo aislado posterior en el tiempo con una resistencia a antibiótico extra además de las que contaba el aislado inicial. A partir de este momento nombraremos como “A” al primer aislado y “B” al segundo aislado de cada pareja. Entre las bacterias seleccionadas encontramos: 4 parejas pertenecientes al complejo *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), 5 parejas de *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), 7 *K. pneumoniae* y 10 parejas de *E. coli*. El complejo *E. cloacae* incluye 6 especies diferentes, difícilmente distinguibles tanto con las técnicas tradicionales de cultivo como mediante MALDITOF. La mayor parte de las infecciones en humanos son causadas por las especies *E. cloacae* y *E. hormaechei*. En la tabla R3 se recogen los diferentes aislados de cada pareja junto con el antibiótico para el que han adquirido resistencia.

Tabla R3. Aislados clínicos seleccionados inicialmente para el estudio de la evolución a corto plazo de enterobacterias multirresistentes. Se muestran los aislados en forma de parejas para los que se recoge la siguiente información: especie bacteriana a la que pertenecen, identificador del aislado A y del B, y antibiótico al que adquiere resistencia el aislado B.

Especie	Aislado A	Aislado B	Resistencia adquirida por B
complejo <i>E. cloacae</i>	235	257	Aztreonam
complejo <i>E. cloacae</i>	1583	1623	Aztreonam
complejo <i>E. cloacae</i>	1625	1659	Aztreonam
complejo <i>E. cloacae</i>	2121	2210	Ertapenem
<i>K. oxytoca</i>	237	246	Doripenem / Imipenem
<i>K. oxytoca</i>	357	430	Cefoxitina
<i>K. oxytoca</i>	506	524	Gentamicina / Tobramicina / Aztreonam / Cefoxitina / Ceftazidima / Ceftriaxona / Cefuroxima
<i>K. oxytoca</i>	1007	1029	Meropenem
<i>K. oxytoca</i>	1798	1835	Aztreonam / Ceftazidima / Ceftriaxona / Cotrimoxazol
<i>K. pneumoniae</i>	132	135	Aztreonam
<i>K. pneumoniae</i>	779	776	Amoxicilina-ácido clavulánico/ Piperacilina-tazobactam
<i>K. pneumoniae</i>	806	861	Ertapenem, Amikacina
<i>K. pneumoniae</i>	1410	1452	Cefuroxima, Cotrimoxazol
<i>K. pneumoniae</i>	1446	1482	Amikacina
<i>K. pneumoniae</i>	1636	1572	Cefoxitina
<i>K. pneumoniae</i>	2164	2169	Amoxicilina-ácido clavulánico/ Piperacilina-tazobactam / Tobramicina
<i>E. coli</i>	77	108	Tobramicina
<i>E. coli</i>	252	275	Amikacina / Tobramicina / Piperacilina-tazobactam
<i>E. coli</i>	148	188	Tobramicina / Gentamicina
<i>E. coli</i>	470	505	Amoxicilina-ácido clavulánico/ Piperacilina-tazobactam
<i>E. coli</i>	521	532	Cotrimoxazol
<i>E. coli</i>	931	948	Ertapenem
<i>E. coli</i>	953	939	Ciprofloxacina / Cotrimoxazol
<i>E. coli</i>	1009	1053	Amoxicilina-ácido clavulánico/ Piperacilina-tazobactam
<i>E. coli</i>	1768	1816	Amoxicilina-ácido clavulánico/ Piperacilina-tazobactam / Imipenem / Gentamicina
<i>E. coli</i>	1928	1932	Gentamicina / Tobramicina / Cotrimoxazol

4.2.2. Utilización de la tecnología de secuenciación masiva para la obtención del genoma completo de los aislados clínicos.

Para las bacterias seleccionadas (Tabla R3) se extrajo su ADN mediante el sistema NucliSENS easyMAG (métodos, apartado 3.3.4.), se midió su concentración mediante cuantificación fluorométrica con Qubit y se secuenció su genoma completo con la plataforma Illumina NextSeq 500 usando el kit de preparación de librerías Nextera XT (métodos, apartado 3.16.2.), obteniendo como resultado lecturas emparejadas de secuencias de ADN de 150 nt.

En nuestro caso, por algún motivo que desconocemos, el número de secuencias iniciales obtenidas fue muy bajo y no nos permitía realizar análisis posteriores de buena calidad, por lo que se decidió repetir la secuenciación reutilizando las librerías generadas. El resultado del número de secuencias en ambas ocasiones se refleja en la figura R26. Como se puede observar, el número de secuencias que se obtuvo en la segunda secuenciación fue superior al de la primera, con una media de 2,2 millones de secuencias (Msec) frente a 0,3 Msec. Por lo tanto, decidimos continuar nuestro estudio utilizando los resultados de esta segunda secuenciación.

No obstante, los aislados 257 y 776 seguían teniendo un número de secuencias bastante bajo, concretamente 0,2 y 0,5 Msec respectivamente, por lo que exclusivamente para estos casos, se decidió concatenar las lecturas obtenidas en ambas secuenciones y aumentar así el número de secuencias a 0,6 Msec en el caso de 257 y 1,3 MSec para la muestra 776. Por tanto, los resultados que se presentan a partir de este momento corresponden al análisis de la segunda secuenciación a excepción de las muestras 257 y 776 para las cuales se han utilizado las lecturas concatenadas de la primera y segunda secuenciación.

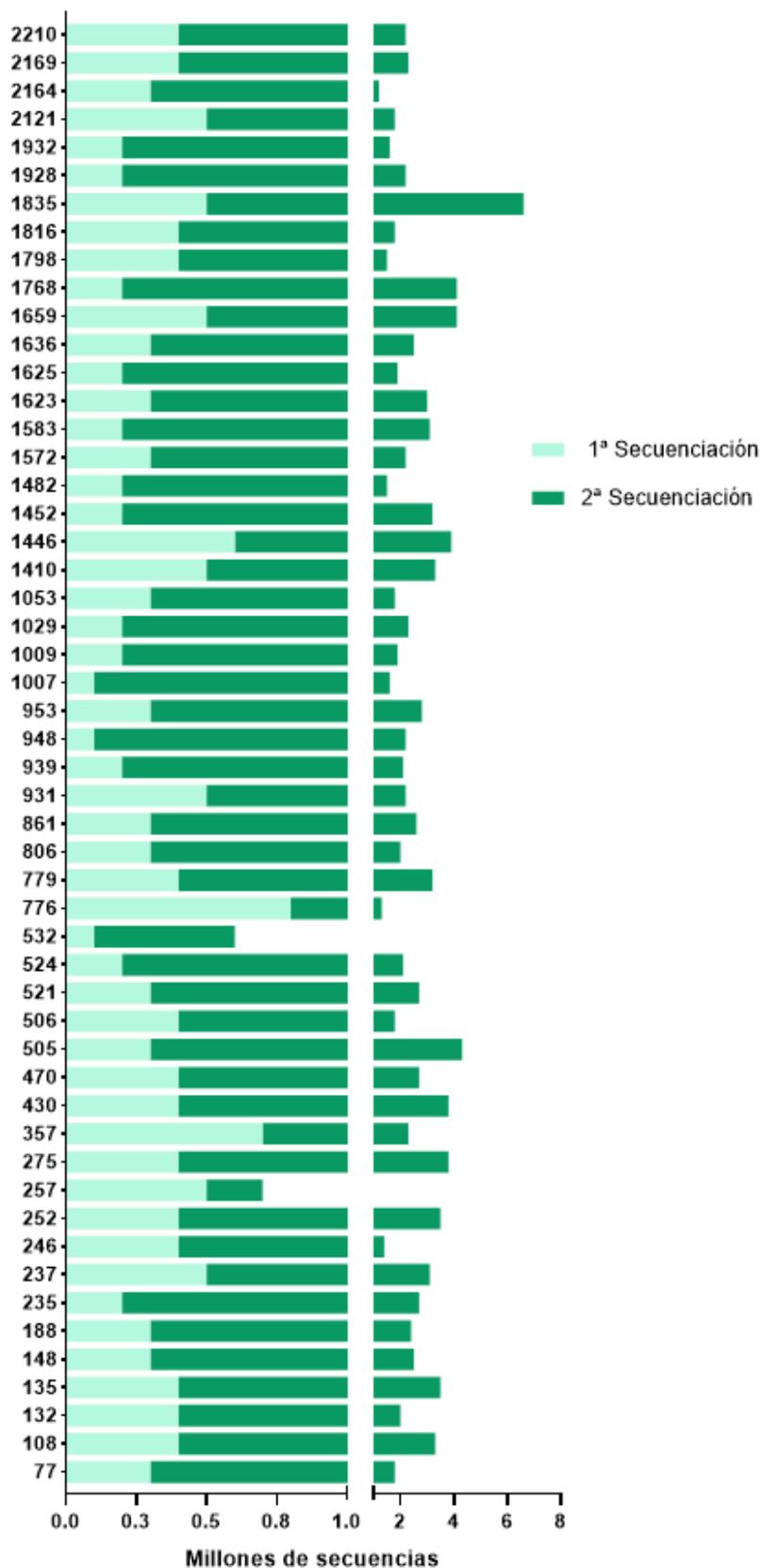


Figura R26. El número de secuencias obtenidas en la segunda secuenciación fue considerablemente superior al de la primera secuenciación. Representación de los millones de secuencias obtenidos tanto en la primera secuenciación (verde claro) como en la segunda secuenciación (verde oscuro) para cada uno de los aislados clínicos.

Las lecturas sin procesar se limpiaron utilizando el programa PRINSEQ para eliminar los adaptadores y secuencias de baja calidad (métodos, apartado 3.18.1) y se utilizó Kmer ID (métodos, apartado 3.18.1.) para verificar la identidad de las cepas. Gracias a este programa se confirmó la taxonomía de las cepas y se identificó a las bacterias del complejo *Enterobacter cloacae* como *Enterobacter hormaechei*.

4.2.3. Análisis de las parejas de muestras para identificar evolución de las cepas frente a co-colonización del paciente.

4.2.3.1. Tipado de los aislados mediante la técnica de MLST.

Nuestro primer objetivo es comprobar si los aislados A y B de cada pareja son realmente una misma cepa que ha evolucionado por la adquisición un mecanismo que le permite ganar una resistencia nueva a un antibiótico, o si estamos detectando dos cepas multirresistentes diferentes pertenecientes a la misma especie bacteriana que se encuentran simultáneamente en el intestino del paciente (co-colonización). Para ello, se tiparon los aislados utilizando la secuencia nucleotídica de varios locus según la técnica MLST por sus siglas en inglés “Multi Locus Sequence Typing”, una técnica muy extendida en epidemiología molecular que permite una caracterización taxonómica de las bacterias atendiendo a la secuencia de fragmentos internos de unos 450-500 pb pertenecientes a, generalmente, 7 genes de mantenimiento también conocidos como *house-keeping* genes (métodos, apartado 3.18.4.). Las diferentes combinaciones de alelos definen el perfil alélico o secuenciotipo (ST) de cada aislado. Los genes de mantenimiento están evolutivamente muy conservados, por lo que no se espera que haya diferencias en el ST de dos miembros de la pareja si se trata realmente de una misma cepa aislada con 15 días de diferencia en las heces de un mismo paciente. De esta forma, descartaremos de nuestro análisis aquellas parejas cuyos miembros A y B no tengan el mismo valor de ST por tratarse de cepas bacterianas diferentes que están co-colonizando al paciente (ver tabla R4A-D color rojo). Además, también se descartaron aquellas parejas en las no ha sido posible identificar el ST de alguno de los miembros por no haber datos disponibles (ND) (ver tabla R4 color marrón).

Como se puede apreciar en la tabla R4 A-D, en la que se detalla el resultado del MLST para cada muestra, los aislados A y B coincidían en su valor de ST para 18 de las parejas iniciales: 3 *E. hormaechei*, 3 *K. oxytoca*, 7 *K. pneumoniae* y 5 *E. coli*. Algunas de estas parejas (5/18), presentaron un porcentaje de identidad inferior a 100% en la identificación de alguno de sus alelos, lo que se refleja en la aparición de un * junto al alelo correspondiente; sin embargo, fueron mantenidas en el análisis porque la información disponible fue suficiente para asignarles un ST. Además, los análisis posteriores nos permitieron confirmar que eran aislados de la misma cepa.

Tabla R4. Resultado del tipado de los aislados clínicos mediante el método MLST. El sombreado de las tablas agrupa los aislados A y B de cada pareja de muestras. **(A)** MLST para los aislados de *E. hormaechei* **(B)** MLST para los aislados de *K. oxytoca* **(C)** MLST para los aislados de *K. pneumoniae* **(D)** MLST para los aislados de *E. coli*. * = El porcentaje de identidad en la asignación de ST es inferior al 100%, ND = no hay datos suficientes para la determinación del ST, NOVEL = la combinación de alelos no ha sido descrita previamente. Las parejas descartadas se han representado en color rojo cuando no coincide el valor de ST para los dos aislados, o en marrón cuando no hay datos disponibles para asignar el ST.

A. MLST *E. hormaechei*

Aislado	ST	<i>dnaA</i>	<i>fusA</i>	<i>gyrB</i>	<i>leuS</i>	<i>pyrG</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>
235	114	53	35	20	44	45	4	6
257	114*	53	35	20*	44	45	4	6
1583	114	53	35	20	44	45	4	6
1623	114	53	35	20	44	45	4	6
1625	114	53	35	20	44	45	4	6
1659	114	53	35	20	44	45	4	6
2121	ND	238*	118*	254*	196*	ND	121*	178*
2210	114	53	35	20	44	45	4	6

B. MLST *K. oxytoca*

Aislado	ST	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
237	145	1	3	2	34	16	34	1
246	145	1	3	2	34	16	34	1
357	145	1	3	2	34	16	34	1
430	145	1	3	2	34	16	34	1
506	ND	22*	19*	ND	10*	ND	2*	ND
524	145	1	3	2	34	16	34	1
1007	145	1	3	2	34	16	34	1
1029	145	1	3	2	34	16	34	1
1798	145*	1	3	2	34	16	34	1*
1835	ND	8*	5*	ND	37*	54*	24*	ND

C. MLST *K. pneumoniae*

Aislado	ST	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
132	15	1	1	1	1	1	1	1
135	15	1	1	1	1	1	1	1
779	377	10	20	2	1	9	11	12
776	377*	10*	20*	2*	1	9*	11*	12
806	437	3	3	1	1	1	1	31
861	437	3	3	1	1	1	1	31
1410	2397*	2	1	1	1	16	1	13*
1452	2397*	2	1	1	1	16	1	13*
1446	15	1	1	1	1	1	1	1
1482	15	1	1	1	1	1	1	1
1636	872	2	1	100	1	7	5	181
1572	872	2	1	100	1	7	5	181
2164	15	1	1	1	1	1	1	1
2169	15	1	1	1	1	1	1	1

D. MLST *E. coli*

Aislado	ST	<i>Adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>
77	10*	10	11	4*	8	8	8	2*
108	10	10	11	4	8	8	8	2
148	359*	43	41	15	90*	11	8	6
188	359	43	41	15	90	11	8	6
252	10	10	11	4	8	8	8	2
275	648	92	4	87	96	70	58	2
470	131	53	40	47	13	36	28	29
505	131	53	40	47	13	36	28	29
521	224	6	4	33	16	11	8	6
532	Novel*	46*	4	33*	16	11	8	6*
931	Novel*	45*	1012*	193	804*	636*	561*	142*
939	Novel*	53*	1012*	193	13	636*	561*	142*
948	648	92	4	87	96	70	58	2
953	131	53	40	47	13	36	28	29
1009	648*	92	4	87	96*	70*	58	2*
1053	648*	92*	4*	87*	96*	70*	58*	2*
1768	297	6	65	32	26	9	8	2
1816	297	6	65	32	26	9	8	2
1928	ND	ND	1012*	192	804*	636*	160*	142
1932	354*	85	88	78	29*	59	58	62

4.2.3.2. Determinación de la distancia filogenética entre los aislados de cada pareja mediante el cálculo de SNPs y su reconstrucción evolutiva.

Sin embargo, a pesar de que la identificación de cepas mediante MLST ha sido, y sigue siendo un método muy utilizado, el disponer del genoma completo de las bacterias nos permite no restringirnos a 7 genes sino utilizar otro tipo de marcadores que puedan indicarnos con mayor exactitud si estamos hablando o no de una misma cepa cuando analizamos las secuencias A y B de una pareja de muestras. Por eso, en segundo lugar, se calculó el número de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) entre las parejas.

Para ello, lo primero que se hizo fue mapear las lecturas filtradas contra una referencia de la especie correspondiente con el programa Snippy y obtener las

posiciones variantes (métodos, apartado 3.18.2.2.). Consideramos variante aquel nucleótido diferente de la referencia que, con un mínimo de 4 lecturas en la posición, esté representado en al menos un 75% de las lecturas que mapean en esa posición. A continuación, el programa snippy-core unió todas las secuencias mapeadas en un mismo fichero alineado tomando la anotación existente de la cepa de referencia (métodos, apartado 3.18.2.2.).

Este alineamiento se utilizó para obtener una matriz de distancias con la ayuda del programa snp-dists (métodos, apartado 3.18.2.2.), que nos indica el número de SNPs existentes entre cada aislado de la misma especie bacteriana. Además, el alineamiento también fue utilizado para la inferencia filogenética mediante el método de máxima verosimilitud utilizando el programa IQ-TREE (métodos, apartado 3.18.3.) . A pesar de que el número de SNPs encontrado para los aislados de una misma pareja fue, en la mayoría de los casos, superior al que *a priori* se esperaría para bacterias de una misma cepa que difieren en un máximo de 15 días entre ellas, ambos resultados coinciden en mostrar que los aislados de una misma pareja están filogenéticamente más próximos entre sí (Figura R27), puesto que acumulan menos SNPs de diferencia que cualquiera de ellos con aislados de otras parejas (Tabla R5), incluso aunque estos tuvieran el mismo ST. La única excepción que encontramos es el aislado 237 de *K. oxytoca*, que presenta mayor número de SNPs con su pareja que con aislados de otras parejas (Tabla R5B). Sin embargo, las diferencias no son lo suficientemente elevadas como para que no aparezca agrupada junto a su pareja en el árbol filogenético (Figura 27B). Salvo para este caso, que será eliminado de los análisis posteriores, asumimos que nos encontramos ante fenómenos de evolución bacteriana intra- paciente en lugar de estar observando fenómenos de co-colonización.

Tabla R5. Los aislados de cada pareja acumulan un menor número de SNPs entre ellos que con respecto al resto de los aislados de esa misma especie. La única excepción encontrada fue el aislado 237 de *K. oxytoca*. **(A)** Número de SNPs acumulados entre los aislados de *E. hormaechei* **(B)** Número de SNPs acumulados entre los aislados de *K. oxytoca* **(C)** Número de SNPs acumulados entre los aislados de *K. pneumoniae* **(D)** Número de SNPs acumulados entre los aislados de *E. coli*. Los colores utilizados agrupan a los aislados A y B de cada pareja con el único objetivo de facilitar la visualización de los resultados.

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

Número de SNPs encontrados entre los aislados de cada especie

A							B						
<i>E. hormaechei</i>							<i>K. oxytoca</i>						
	1583	1623	1625	1659	235	257		237	246	357	430	1007	1029
1583	0	11	47	45	63	100	237	0	28	14	11	16	16
1623	11	0	29	35	72	92	246	28	0	36	31	33	39
1625	47	29	0	21	78	91	357	14	36	0	8	15	14
1659	45	35	21	0	65	93	430	11	31	8	0	9	14
235	63	72	78	65	0	52	1007	16	33	15	9	0	7
257	100	92	91	93	52	0	1029	16	39	14	14	7	0

C														
<i>K. pneumoniae</i>														
	132	135	779	776	806	861	1410	1452	1446	1482	1636	1572	2164	2169
132	0	35	29288	30410	29498	28750	29263	29312	135	118	28832	28822	201	204
135	35	0	28716	29712	28766	28023	28477	28531	100	108	28308	28297	172	172
779	29288	28716	0	53	27983	27275	26990	27008	29249	29254	27517	27493	29024	29017
776	30410	29712	53	0	29224	28516	28099	28150	30390	30399	28645	28626	30184	30173
806	29498	28766	27983	29224	0	13	28615	28651	29428	29427	28457	28430	29305	29285
861	28750	28023	27275	28516	13	0	27842	27874	28679	28670	27839	27827	28541	28517
1410	29263	28477	26990	28099	28615	27842	0	14	29221	29216	27660	27648	29680	29664
1452	29312	28531	27008	28150	28651	27874	14	0	29279	29264	27709	27695	29733	29724
1446	135	100	29249	30390	29428	28679	29221	29279	0	25	28815	28789	508	507
1482	118	108	29254	30399	29427	28670	29216	29264	25	0	28813	28787	514	511
1636	28832	28308	27517	28645	28457	27839	27660	27709	28815	28813	0	19	28670	28648
1572	28822	28297	27493	28626	28430	27827	27648	27695	28789	28787	19	0	28644	28619
2164	201	172	29024	30184	29305	28541	29680	29733	508	514	28670	28644	0	9
2169	204	172	29017	30173	29285	28517	29664	29724	507	511	28648	28619	9	0

D										
<i>E. coli</i>										
	77	108	470	505	148	188	1009	1053	1768	1816
77	0	13	92747	92769	49180	49178	88502	88542	47995	47932
108	13	0	92822	92842	49282	49274	88528	88564	48073	48007
470	92747	92822	0	26	90830	90815	79468	79483	91574	91439
505	92769	92842	26	0	90866	90851	79478	79491	91592	91460
148	49180	49282	90830	90866	0	3	86741	86713	24807	24777
188	49178	49274	90815	90851	3	0	86714	86686	24784	24756
1009	88502	88528	79468	79478	86741	86714	0	46	86932	86851
1053	88542	88564	79483	79491	86713	86686	46	0	87042	86958
1768	47995	48073	91574	91592	24807	24784	86932	87042	0	17
1816	47932	48007	91439	91460	24777	24756	86851	86958	17	0

Reconstrucción de la distancia filogenética entre los aislados de cada especie

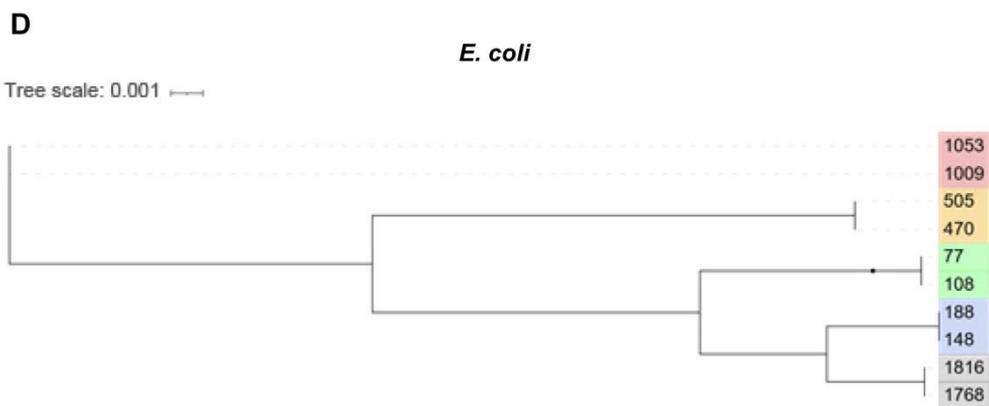
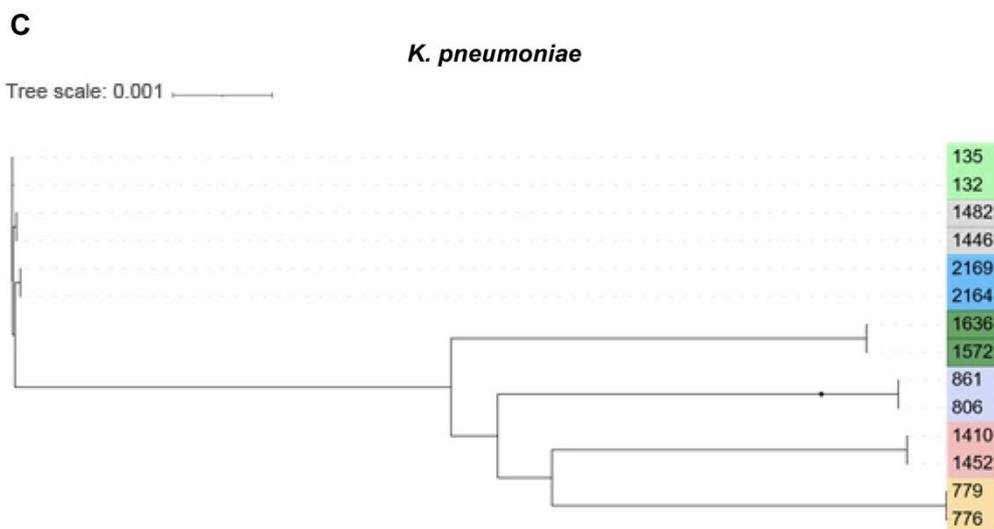
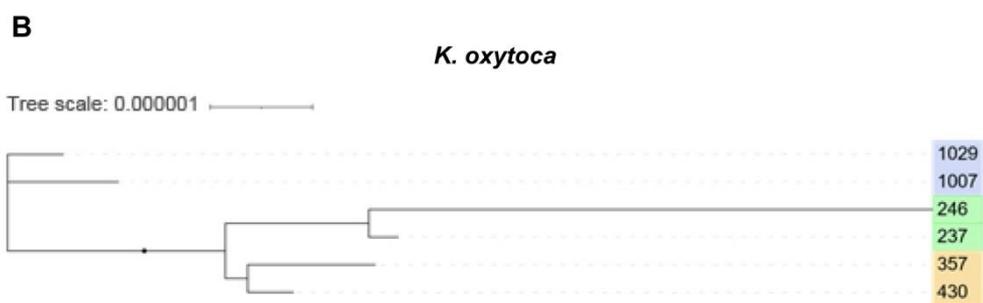
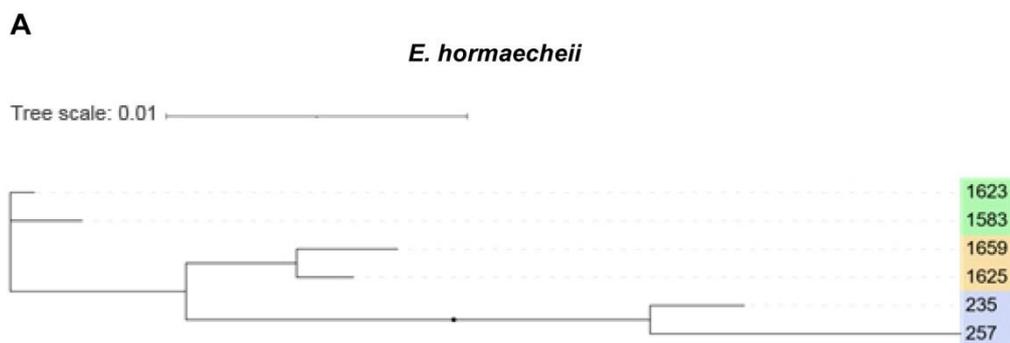


Figura 27. Los aislados A y B están filogenéticamente más próximos entre sí que con respecto a los aislados de otras parejas. Reconstrucción de la distancia filogenética entre los aislados de cada especie mediante el método de máxima verosimilitud. Los colores utilizados agrupan a los aislados A y B de cada pareja con el único objetivo de facilitar la visualización de los resultados. **(A)** *E. hormaechei* **(B)** *K. oxytoca* **(C)** *K. pneumoniae* **(D)** *E. coli*.

Adicionalmente, con el objetivo de dar respuesta al elevado número de SNPs registrado en las parejas, se realizó un estudio de localización de estos SNPs dentro del genoma. La concentración de SNPs en un mismo gen o la mutación de genes relacionados con el sistema de corrección de errores podrían facilitar la explicación de este fenómeno. Sin embargo, no fue habitual encontrar más de 3 SNPs acumulados en un mismo gen y en aquellos casos en los que sí que ocurrió, el gen en el que se acumulaban no tenía relación con la resistencia a antibióticos: oxalacetato descarboxilasa (4 SNPs en la pareja 7, ver tabla R6, represor de regulón glicerol-3-fosfato (6 SNPs en la pareja 8, ver tabla R6) y serina-D deshidratasa (8 SNPs en la pareja 15, ver tabla R6).

4.2.4. Análisis de las secuencias de ADN de los aislados con el objetivo de detectar fenómenos de TGH que puedan explicar la evolución *in vivo* de las cepas clínicas.

Con todos estos análisis previos, se establecieron las 17 parejas (Tabla R6) sobre las que se estudió más detenidamente su evolución *in vivo* a corto plazo, con un foco especial en la adquisición de material genético y más concretamente de genes de resistencia a antibióticos. La reconstrucción del genoma de estas bacterias se realizó mediante el ensamblado de las lecturas filtradas utilizando el programa Unicycler (métodos, apartado 3.18.2.1.) y su calidad se comprobó con QUAST, que proporciona un informe con parámetros de calidad relevantes como el número de contigs en cada muestra y el tamaño de genoma ensamblado, datos que se recogen en la tabla R6.

Tabla R6. Aislados clínicos que se mantienen después de la determinación del ST y detección de SNPs para el estudio de la evolución a corto plazo de enterobacterias multirresistentes. Se muestran los aislados en forma de parejas para los que se recoge la siguiente información: especie bacteriana a la que pertenecen, identificador (id), número de contigs y tamaño ensamblado (Mpb) para los aislados A y B, y antibiótico al que adquiere resistencia el aislado B.

4. Resultados

Pareja	Especie	Aislado A			Aislado B			Resistencia adquirida por B
		Id	nº contigs	Tamaño ensamblado	id	nº contigs	Tamaño ensamblado	
1	<i>E. hormaechei</i>	235	94	5,04	257	131	6,48	Aztreonam
2	<i>E. hormaechei</i>	1583	84	5,12	1623	93	5,12	Aztreonam
3	<i>E. hormaechei</i>	1625	91	5,09	1659	80	5,1	Aztreonam
4	<i>K. oxytoca</i>	357	106	6,47	430	114	6,47	Cefoxitina
5	<i>K. oxytoca</i>	1007	111	6,33	1029	96	6,97	Meropenem
6	<i>K. pneumoniae</i>	132	101	5,68	135	105	5,59	Aztreonam
7	<i>K. pneumoniae</i>	779	85	5,24	776	100	5,43	Amoxicilina-ácido clavulánico/Piperacilina-tazobactam
8	<i>K. pneumoniae</i>	806	77	5,59	861	84	5,49	Ertapenem, Amikacina
9	<i>K. pneumoniae</i>	1410	88	5,7	1452	97	5,7	Cefuroxima, Cotrimoxazol
10	<i>K. pneumoniae</i>	1446	99	5,76	1482	113	5,75	Amikacina
11	<i>K. pneumoniae</i>	1636	129	5,27	1572	129	5,26	Cefoxitina
12	<i>K. pneumoniae</i>	2164	100	5,57	2169	91	5,57	Amoxicilina-ácido clavulánico/Piperacilina-tazobactam / Tobramicina
13	<i>E. coli</i>	77	171	4,88	108	168	5,02	Tobramicina
14	<i>E. coli</i>	148	107	5,24	188	103	5,24	Tobramicina / Gentamicina
15	<i>E. coli</i>	470	175	5,04	505	173	5,05	Amoxicilina-ácido clavulánico/Piperacilina-tazobactam
16	<i>E. coli</i>	1009	118	5,38	1053	161	5,43	Amoxicilina-ácido clavulánico/Piperacilina-tazobactam
17	<i>E. coli</i>	1768	120	5,04	1816	123	5,05	Amoxicilina-ácido clavulánico/Piperacilina-tazobactam / Imipenem / Gentamicina

Las resistencias a los antimicrobianos adquiridas por los aislados B de cada pareja no parecen regirse por fenómenos aleatorios pues, como vemos en la tabla R5, solo algunos de los 17 antibióticos testados aparecen como resistentes repitiéndose en varias ocasiones. Cabe señalar que estos aislados son de entrada multirresistentes, por lo que la adquisición se suma al fenotipo de resistencia inicial. El porcentaje de aislados con resistencia inicial para cada antibiótico se puede observar en la figura R28A. Destaca la resistencia a ampicilina, que es común para todas las cepas y los resultados para cefuroxima, ceftriaxona, ciprofloxacina y cotrimoxazol que superan el 80% de aislados A detectados como resistentes. La ciprofloxacina es un antibiótico utilizado como profiláctico en pacientes con leucemia aguda. Así pues, es esperable una elevada prevalencia de resistencia a ciprofloxacina en las bacterias que colonizan el intestino de estos pacientes. Por otro lado, ningún aislado A presentaba resistencia ni a amikacina ni a colistina, siendo estos antibióticos todavía un tratamiento eficaz para la eliminación de las enterobacterias. Sin embargo, 2 de las parejas estudiadas adquirieron durante el estudio resistencia a amikacina (Figura 28B) evidenciando la buena capacidad de estas bacterias para la evolución en la adquisición de resistencias; además, se han descrito ya los primeros casos de enterobacterias resistentes a colistina en los pacientes con leucemia de este hospital (2). Cabe destacar que para la mayoría de las muestras no se dispone de los datos de sensibilidad a meropenem, por lo que se decidió no incluirlo en el recuento de resistencias originales apareciendo en el gráfico como ND. Los antibióticos para los que más eventos de adquisición de resistencias se han reportado en nuestros datos son las combinaciones de piperacilina-tazobactam y amoxicilina-clavulánico (Figura R28B) para los que 5 aislados (de al menos dos especies bacterianas diferentes) han adquirido resistencia.

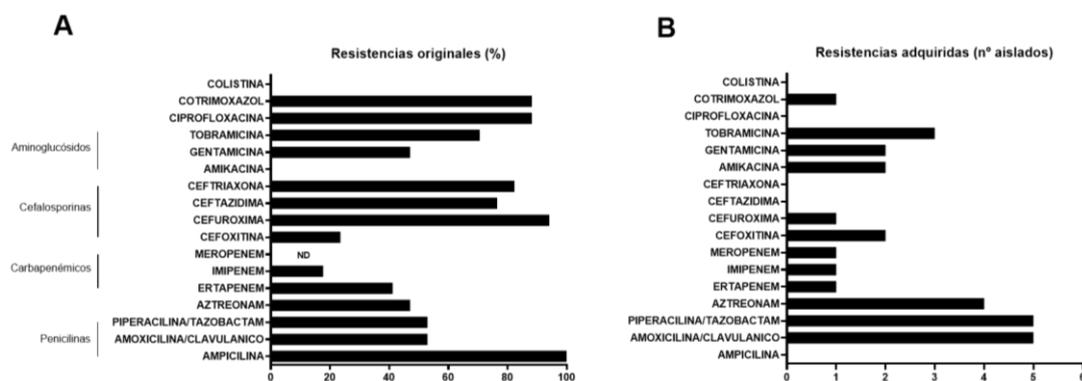


Figura R28. La presencia y adquisición de resistencias a antibióticos en los aislados clínicos de enterobacterias no se distribuye de forma equitativa. (A) Porcentaje de parejas para los que el aislado A presenta resistencia a los antibióticos estudiados. ND = No hay datos suficientes. **(B)** Número de ocasiones en el que el aislado B de la pareja adquiere resistencia a los antibióticos estudiados.

Con el objetivo de intentar explicar genéticamente la aparición fenotípica de una nueva resistencia a antibiótico en los aislados B de cada pareja, se utilizó en primer lugar ARIBA, un programa desarrollado en 2017 por el Instituto Sanger que permite una identificación rápida de genes de resistencia, virulencia y plásmidos presentes en las muestras utilizando las lecturas filtradas. En nuestro caso se utilizaron las bases de datos PlasmidFinder y MEGARes para la identificación de plásmidos y genes de resistencia a antibiótico respectivamente (métodos, apartado 3.18.5). Una vez tuvimos el resultado para cada uno de los aislados, se compararon las parejas para tratar de identificar genes o plásmidos que hubiesen sido adquiridos por el aislado B y, en tal caso, si éstos pudieran justificar la adquisición de la resistencia fenotípica observada. Adicionalmente, se confirmaron estos resultados mediante la herramienta BLAST implementada en el programa BANDAGE, buscando los genes detectados por ARIBA en las secuencias ensambladas de los aislados A y B. Además, para complementar los resultados, y puesto que se ha secuenciado el genoma completo de estas bacterias, se compararon las secuencias ensambladas de los aislados A y B de cada pareja a través de BANDAGE. En caso de encontrar información genética adquirida para el aislado B, se buscó la anotación asignada mediante Prokka (métodos, apartado 3.18.2.1.) que nos permite conocer la función de estos genes y se intenta averiguar su localización (plasmídica o cromosómica) observando el resto de genes que le acompañan en ese mismo fragmento ensamblado o contig. Por último, para cada pareja se localizó la posición de sus SNPs pudiendo detectar de este modo posibles mutaciones en genes

importantes para la resistencia a antibióticos o incluso en los promotores de dichos genes que puedan modificar la expresión de las proteínas para las que codifican. Con toda esta información, que va a ser detallada a continuación para cada pareja, intentamos explicar la adquisición de resistencias a antibióticos reportada en los laboratorios clínicos.

Pareja 1:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
235	257	<i>E. hormaechei</i>	Aztreonam

Los resultados de ARIBA detectaban la adquisición de una betalactamasa tipo TEM en el aislado B de la pareja. Existen diferentes tipos de betalactamasas TEM y su actividad antibiótica varía ligeramente entre unas y otras de forma que no todas son capaces de hidrolizar aztreonam. La secuencia del gen detectado por ARIBA se buscó utilizando la herramienta BLAST implementada en BANDAGE en ambos aislados de la pareja, detectándose exclusivamente en el aislado B, corroborando de este modo los resultados obtenidos con ARIBA. Sin embargo, el contig en el que encontramos la supuesta betalactamasa, únicamente tenía anotado un transposón Tn3 y ningún gen de resistencia a antibiótico. Para verificar el resultado, se realizó BLAST con la secuencia completa del contig contra la base de datos de NCBI obteniéndose 100% identidad y 99,31% cobertura con un plásmido descrito de *K. pneumoniae* (nº acceso GenBank: 065454.1) que contiene la betalactamasa TEM-31.

Al comparar mediante BLAST la secuencia de esta betalactamasa con la obtenida mediante el resultado de ARIBA, vemos que tienen un 100% de identidad y cobertura. Estos datos nos sugieren que el gen que estamos detectando en el aislado B de esta pareja podría codificar para una betalactamasa TEM-31, que confiere resistencia a antibióticos monobactámicos como el aztreonam. El hecho de haber encontrado en el mismo contig anotado un gen que codifica para el transposón Tn3 podría indicarnos que el gen de la betalactamasa se ha incorporado en el genoma del aislado B mediante este transposón.

Pareja 2:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
1583	1623	<i>E. hormaechei</i>	Aztreonam

Los análisis de ARIBA no fueron capaces de detectar en este caso ningún gen de resistencia a antibióticos adquirido por el aislado B de la pareja. Sin embargo, se detectó, con una identidad del 96,12%, un plásmido Col(pHAD28) (nº acceso KU674895.1). Esta coincidencia con un plásmido se debe a un contig de 2496 pb y una profundidad de 220,33X exclusivo del aislado B. La secuencia de este contig fue lanzada contra la base de datos de NCBI obteniendo un 100% de identidad y de cobertura con el plásmido Col(pHAD28) de *K. pneumoniae* (nº acceso CP052502.1). Estos datos sugieren, por tanto, que el aislado B habría adquirido mediante TGH un plásmido de tipo Col(pHAD28); sin embargo, este plásmido no contiene ningún gen de resistencia a antibióticos por lo que, aunque detectamos TGH en esta pareja, no somos capaces de explicar la adquisición de la resistencia a aztreonam.

Pareja 4:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
357	430	<i>K. oxytoca</i>	Cefoxitina

Al utilizar ARIBA con los aislados de esta pareja se detectó la adquisición de un gen *bla*_{OXA-48} cuya ausencia en el aislado A y presencia en el aislado B fue comprobada, como en todos los casos, mediante BLAST con las secuencias ensambladas. Sin embargo, el contig en el que encontramos este gen tiene una profundidad de 2,61X y solo 1500 pb, por lo que su anotación no nos permite concluir la localización cromosómica o plasmídica de la betalactamasa. ARIBA, mediante la base de datos PlasmidFinder, detectaba los mismos plásmidos para los dos aislados, entre ellos un plásmido IncL, en los que es habitual encontrar el gen *bla*_{OXA-48}. Para comprobar si el gen adquirido se ha integrado en este plásmido, se comparó la secuencia anotada del plásmido de referencia conteniendo *bla*_{OXA-48} (nº acceso NC_019154.1) con las secuencias ensambladas de ambos aislados mediante la herramienta BLAST implementada en el visor de genomas CGView Server. Como se puede apreciar en la

figura R29, el plásmido del aislado A (verde) no contenía la betalactamasa *bla*_{OXA-48} (*bla*), mientras que ésta sí que está presente en el aislado B (naranja). Además, esta betalactamasa se encuentra flanqueada por transposasas IS10A lo que sugiere que haya podido haber una integración del transposón con el gen de resistencia.

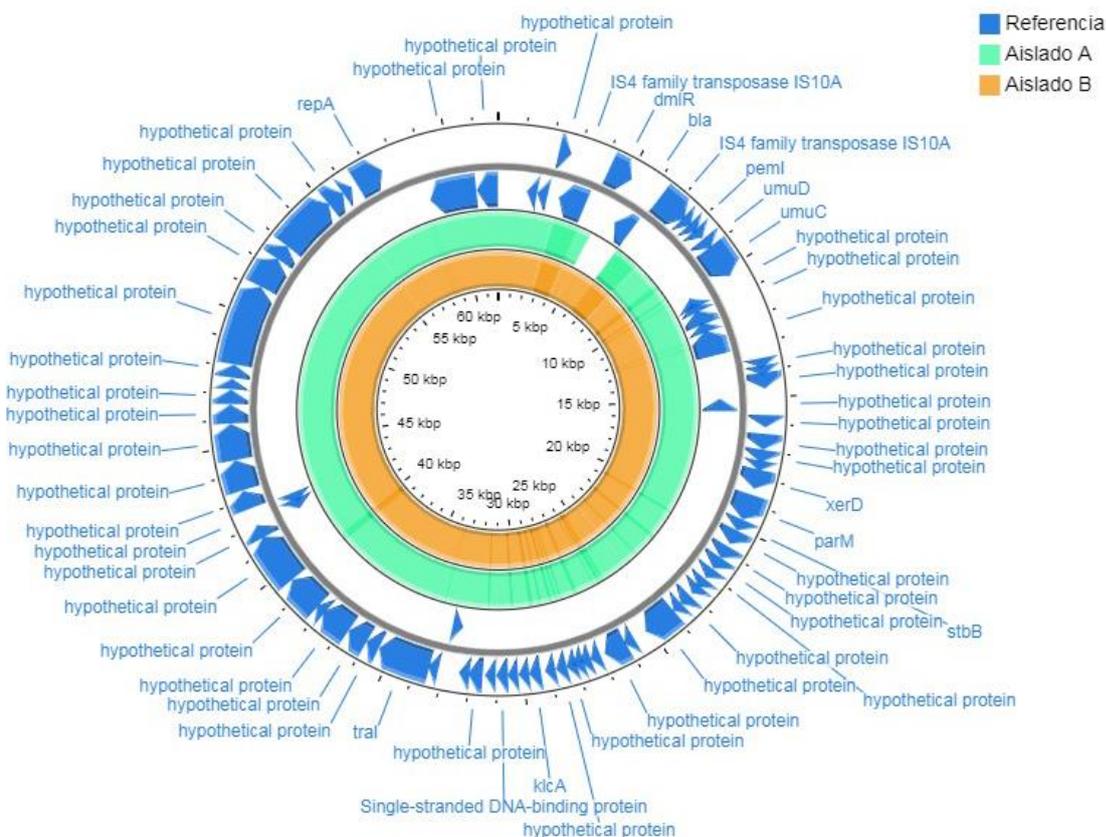


Figura R29. El aislado B de la pareja 4 adquiere un transposón con una betalactamasa *bla*_{OXA-48} que se integra en el interior del plásmido Incl. Representación mediante CGView Server de la comparación mediante BLAST de las secuencias de los aislados A (verde) y B (naranja) de la pareja 4 frente al plásmido de referencia (azul) conteniendo el gen de resistencia a antibiótico *bla*_{OXA-48} (*bla*) (NC_019154.1).

Sin embargo, el gen *bla*_{OXA-48} no explicaría el fenotipo de resistencia a cefoxitina adquirido por el aislado B de la pareja. El estudio de las posiciones en las que se encuentran los SNPs en el genoma revela una mutación en el gen que codifica para la proteína de membrana externa BamA. Esta proteína forma parte del complejo BAM, un subgrupo de porinas que controla la permeabilidad de la membrana celular. Dado que los antibióticos betalactámicos utilizan las porinas como medio de entrada en las células bacterianas, una mutación en estas proteínas que las hiciera más resistentes a la entrada de sustancias podría explicar la resistencia a cefoxitina.

Pareja 5:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
1007	1029	<i>K. oxytoca</i>	Meropenem

Los análisis realizados con ARIBA y mediante la comparación de las secuencias ensambladas no detectaron adquisición genética por parte del aislado B de esta pareja. Al estudiar la posición de los SNPs entre los aislados, se encuentra una mutación en el gen que codifica para la proteína de membrana externa BamA, como en el caso de la pareja anterior. Aunque en este caso el antibiótico para el que se adquiere resistencia es un carbapenémico en lugar de una cefalosporina, ambos pertenecen al grupo de antibióticos betalactámicos que comparten la misma vía de entrada a la célula bacteriana, por lo que una mutación en el complejo BAM podría explicar también esta resistencia.

Pareja 6:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
132	135	<i>K. pneumoniae</i>	Aztreonam

Tanto los resultados de ARIBA como la comparación de los ensamblados en BANDAGE no nos permiten detectar ninguna ganancia de material genético en el aislado B de la pareja. Sin embargo, el estudio de la posición de los SNPs en el genoma reveló la existencia de una mutación en un gen que codifica para un transportador de membrana encargado de la incorporación de péptidos antimicrobianos al interior celular (Sbma). El uso de este transportador está descrito para las microcinas 25 y B17, la klebsazolina y péptidos antimicrobianos ricos en prolina como la Cathelicidina-3 o Arasina-1 (169). En caso de que el antibiótico aztreonam pudiera hacer uso de estas proteínas de membrana para su entrada en la bacteria, una mutación en ellas podría aumentar su resistencia. Sin embargo, no hemos visto que se haya descrito hasta la fecha una relación entre esta proteína y el antibiótico para el que se ha adquirido resistencia.

Pareja 7:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
779	776	<i>K. pneumoniae</i>	Amoxicilina-ácido clavulánico / Piperacilina-tazobactam

Para esta pareja, no se detectó la adquisición de ningún plásmido ni de ningún gen de resistencia a antibióticos mediante ARIBA. La comparación de las secuencias ensambladas mostró la adquisición de varios contigs que sumaban más de 180000 nt. Sin embargo, en la anotación de estos contigs no aparecía nada que pareciera estar relacionado con el fenotipo resistente adquirido por el aislado B. La localización de los SNPs en el genoma detectó una mutación en la proteína K de un sistema de secreción tipo II. Aunque no parece haber una relación directa entre este SNP encontrado entre los aislados A y B y el cambio fenotípico, podemos hipotetizar que en caso de que el sistema de secreción pueda ser utilizado por la bacteria para eliminar betalactamasas al medio externo, una mutación que aumentase su actividad secretora podría incrementar los niveles de betalactamasas en el medio haciendo insuficiente la acción de los inhibidores betalactámicos y convirtiendo a la bacteria, por tanto en resistente a estos fármacos.

Pareja 8:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
806	861	<i>K. pneumoniae</i>	Amikacina / Ertapenem

ARIBA no detectó la adquisición de plásmidos ni de genes de resistencia para el aislado B de esta pareja. No obstante, al comparar las secuencias ensambladas de ambos aislados se observó en torno a 10000 nt pertenecientes a distintos contigs, pero exclusivos del aislado B. A pesar de que en la anotación de estos contigs no se encontraron genes que pudiesen explicar la resistencia adquirida, parece que podría haber habido ganancia de EGM pues encontramos genes que codifican para proteínas de partición y transposasas de diferentes familias (IS3, IS10). La localización de los SNPs en el genoma mostró una mutación en el gen que codifica para la betalactamasa de amplio espectro SHV-1. Existen numerosas variantes de las betalactamasas de

espectro extendido SHV, sin embargo, únicamente la variante SHV-38 es capaz de hidrolizar antibióticos carbapenémicos (170). La variante SHV-38 difiere únicamente de la SHV-1 en la pérdida de un aminoácido, por lo que una mutación que llevase a la delección de este aminoácido podría convertir a la cepa en resistente a ertapenem. Sin embargo, los datos que tenemos no explican la resistencia adquirida a amikacina.

Pareja 10:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
1446	1482	<i>K. pneumoniae</i>	Amikacina

Los análisis realizados con ARIBA en esta pareja no fueron capaces de detectar ninguna ganancia de genes de resistencia; sin embargo, sí que se detectó la adquisición de un plásmido extra en el aislado B. Se trata de un plásmido pequeño, de 2000 pb, detectado en las secuencias ensambladas con una profundidad de 1,77x, y llamado Col(BS512) (nº acceso NC010656). A pesar de que este plásmido no contiene ningún gen de resistencia a antibióticos que pueda explicar la resistencia a amikacina, evidencia la existencia de TGH en las muestras *in vivo* de los pacientes.

Pareja 11:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
1636	1572	<i>K. pneumoniae</i>	Cefoxitina

Los resultados de ARIBA no muestran adquisición de plásmidos ni de genes de resistencia a antibióticos para el aislado B de esta pareja, al igual que tampoco se detectó ninguna adquisición génica mediante la comparación de las secuencias ensambladas. Sin embargo, la localización de los SNPs existentes entre los aislados detectó una mutación en el gen que codifica para la proteína de membrana externa BamA, al igual que ocurría en las parejas 4 y 5. Además, para una de ellas, la resistencia a antibiótico detectada era también cefoxitina y en los tres casos estamos ante resistencias a betalactámicos por lo que se refuerza la idea de que una mutación en este transportador de membrana podría estar favoreciendo la resistencia a este grupo de antibióticos. Curiosamente, las parejas en las que se ha detectado la mutación en el

gen que codifica para la proteína BamA pertenecen a tres especies clínicas diferentes: *E. hormaechei*, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*. Sería interesante realizar un estudio comparativo de los genes *bamA* de estas tres parejas para saber si la mutación encontrada ocurre siempre en la misma región génica afectando de igual modo a la proteína resultante o si mutaciones en distintos puntos del gen pueden tener un efecto similar en la funcionalidad de la proteína resultante.

Pareja 13:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
77	108	<i>E. coli</i>	Tobramicina

Para esta pareja, ARIBA no detectó adquisición de genes de resistencia a antibióticos; sin embargo, sí que detectó la adquisición del plásmido Inc11-I(Alpha) (nº acceso AP005147). Mediante la herramienta BLAST implementada en BANDAGE, se localizó el plásmido adquirido en un contig de 31000 pb y profundidad 0,67X parcialmente compartido entre los aislados de la pareja. La anotación de este contig reveló la adquisición de un gen que codifica para una proteína de resistencia a Tetraciclina y de un gen que codifica para la betalactamasa SHV-2. Estos genes de resistencia a antibióticos podrían haberse introducido en la bacteria mediante el plásmido Inc11. A pesar de que estos genes no explican las resistencias clínicas que se observan en el caso del aislado B, evidencian la existencia de fenómenos de TGH en los pacientes in vivo. La comparación de las secuencias ensambladas nos permitió detectar otros contigs exclusivos del aislado B. En uno de ellos (de 6000 pb y profundidad 1,96X) se detectó un gen que codifica para el enzima Aminoglucósido N(6')-acetiltransferasa tipo 1 (AAC6) acompañado de proteínas de movilización (MbeC) y ADN relaxasa (MbeA). La comparación de la secuencia de este contig con la base de datos de NCBI sugiere que el gen que codifica para AAC6 y que explicaría la resistencia a tobramicina viaja en un plásmido conjugativo que tiene una identidad del 100% y cobertura de 99,94% con el plásmido pCY-MdT de *Enterobacter cloacae* (nº acceso KF998105.1).

Pareja 16:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
1009	1053	<i>E. coli</i>	Amoxicilina-ácido clavulánico / Piperacilina-tazobactam

Los resultados de ARIBA para esta pareja no detectaron adquisición de plásmidos ni de genes de resistencia a antibióticos en el aislado B. La comparación de las secuencias ensambladas permitió detectar algunos contigs exclusivos del aislado B. En uno de estos contigs, de 10979 pb y 1,05X de profundidad, se anotaron genes que codifican para: el enzima Estreptomicina 3'-adenililtransferasa, un transportador de antibióticos EmrE (confiere resistencia a tetraciclina y aminoglucósidos) y una bomba de flujo Tap (confiere resistencia a aminoglucósidos, estreptomicina y tobramicina además de otros compuestos tóxicos como propidio, etidio, acriflavina, etc.) Estos genes se encuentran junto a una transposasa IS6100 que podría haberlos movilizado mediante TGH al interior del genoma bacteriano. A pesar de que, según la información disponible hasta la fecha, estos genes no explican la resistencia a antibióticos adquirida por la bacteria, evidencian la existencia de fenómenos de TGH a través de EGM en la microbiota de los pacientes *in vivo*.

Pareja 17:

Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
1768	1816	<i>E.coli</i>	Amoxicilina-ácido clavulánico / Piperacilina-tazobactam / Imipenem / Gentamicina

Para esta pareja, ARIBA detectaba la adquisición de un gen *bla*_{OXA-48} que explicaría la resistencia a los antibióticos betalactámicos y la adquisición de un plásmido IncL (nº acceso JN626286). La secuencia del gen detectado por ARIBA se buscó utilizando la herramienta BLAST implementada en BANDAGE en ambos aislados de la pareja, detectándose exclusivamente en el aislado B, en un contig con una profundidad de 2,21X, pero únicamente 1524 pb por lo que su anotación no nos aportó información sobre su localización. El plásmido detectado se buscó del mismo modo en las secuencias ensambladas detectándose en un contig también exclusivo del

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

aislado B, de 26700 pb y 1,67X, conteniendo genes que se anotan como proteínas hipotéticas y un gen que codifica para un inicio de la replicación. Además, la comparación de las secuencias ensambladas de ambos aislados detectó otros contigs exclusivos del aislado B en los que se anotaron genes que evidencian la adquisición de algún plásmido conjugativo pues codifican para proteínas de segregación de plásmidos (ParM), proteínas que participan en la conjugación (StbB) y proteínas de movilización (MbeC). Todos estos datos sugieren que podría haber habido adquisición por TGH de un plásmido IncL portador de un gen de resistencia *bla*_{OXA-48} que explicaría la resistencia a los betalactámicos. Sin embargo, queda sin ser explicada la resistencia adquirida por el aislado B a gentamicina.

Pareja 3, 9, 12, 14, 15:

Pareja	Aislado A	Aislado B	Especie	Resistencia adquirida
3	1625	1659	<i>E. hormaechei</i>	Aztreonam
9	1410	1452	<i>K. pneumoniae</i>	Cefuroxima / Cotrimoxazol
12	2164	2169	<i>K. pneumoniae</i>	Amoxicilina-ácido clavulánico / Piperacilina-tazobactam / Tobramicina
14	470	505	<i>E. coli</i>	Amoxicilina-ácido clavulánico / Piperacilina-tazobactam
15	148	188	<i>E. coli</i>	Gentamicina / Tobramicina

Los análisis realizados mediante ARIBA y la comparación de las secuencias ensambladas en BANDAGE no revelan ninguna adquisición genética relevante en el aislado B de estas parejas. Tampoco el estudio de los SNPs muestra que exista alguna acumulación de mutaciones en el genoma, mutaciones en genes que pudieran estar relacionados con la resistencia a antibióticos como porinas o transportadores de membrana ni mutaciones en los promotores de genes de resistencia existentes en la cepa que pudieran haber visto aumentada su expresión génica y por tanto ampliar el fenotipo resistente de la bacteria.

De forma general podemos concluir que mediante las técnicas utilizadas somos capaces de diferenciar entre dos posibles escenarios clínicos. En uno, distintas EMR pertenecientes a la misma cepa colonizan simultáneamente el intestino de los

pacientes mientras que en el otro detectamos una cepa EMR que persiste en el intestino del paciente y evoluciona adquiriendo nuevas resistencias a agentes antimicrobianos. Además, detectamos un alto grado de TGH de material genético in vivo en las cepas multirresistentes de pacientes hospitalizados; sin embargo, esta TGH no siempre viene ligada con la adquisición de un fenotipo resistente a antibióticos. Otros mecanismos, como las mutaciones puntuales en genes que codifican para enzimas o transportadores de membrana pueden estar ejerciendo un papel fundamental, y deben ser tenidos en cuenta, en la adquisición de las resistencias detectadas en el laboratorio. También cabe señalar que este estudio se encuentra limitado a los genes descritos previamente en las bases de datos utilizadas, por lo que nuevos mecanismos de resistencia o proteínas todavía no descritas estarían escapando a nuestro análisis.

4.3. Estudio de la interacción dieta-microbiota en las infecciones producidas por patógenos multirresistentes.

La diseminación de genes de resistencia a antibióticos (GRAs) es un fenómeno cada vez más común que, como ya hemos comentado anteriormente, no está restringido únicamente a los ambientes hospitalarios, sino que otros hábitats como el suelo, las plantas de aguas residuales o cualquier otro ambiente en que la densidad bacteriana sea especialmente elevada favorece este intercambio de genes. La microbiota intestinal, debido a sus características de elevada densidad bacteriana y continuo flujo de nutrientes se convierte en un punto caliente para los fenómenos de diseminación de EGM que contienen estos GRAs (4).

Como ya sabemos, patógenos oportunistas como las enterobacterias pueden actuar a modo de reservorios de GRAs favoreciendo la diseminación de estos en los momentos de disbiosis en los que tienen oportunidad de expandir en el intestino. Uno de los principales factores causantes de disbiosis intestinal es el tratamiento con antibióticos, sin embargo, estudios clínicos muestran que, en ocasiones, algunos pacientes pueden colonizarse por bacterias multirresistentes sin haber recibido tratamiento antibiótico (171). Otro de los factores que ejerce un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis intestinal es la dieta (19). De hecho, las dietas ricas en grasas y/o azúcares simples que recientemente se están implantando en nuestras sociedades occidentales (dieta occidental, DO) pueden eliminar bacterias comensales concretas resultando en una disminución significativa de la diversidad microbiana (11). Por tanto, nos planteamos si una dieta occidental (DO) podría favorecer la diseminación de plásmidos conjugativos que contienen GRAs mediante la facilitación de la colonización y expansión intestinal de patógenos oportunistas como *E. coli*.

4.3.1. Dieta y colonización por patógenos multirresistentes

Para evaluar si existen diferencias significativas en la colonización de patógenos oportunistas según la dieta consumida, se alimentaron ratones bien con dieta control (DC) bien con dieta occidental (DO) durante 8 semanas (métodos, Figura M13A), un periodo extenso que pretende mimetizar la condición de los individuos que toman la dieta occidental de manera constante durante su vida. Transcurrido este tiempo se inocularon mediante sonda nasogástrica 10^8 UFC de la cepa CU9, una cepa de *E. coli* DH5 α a la que previamente se le había insertado en su cromosoma el gen *cat* que confiere de resistencia a cloranfenicol y se estudió la capacidad de colonización de esta bacteria mediante su detección en heces el primer y segundo día tras la inoculación.

Los resultados muestran que, como ya sabíamos, los ratones alimentados con DC sin tratamiento antibiótico son resistentes a la colonización por esta enterobacteria pudiéndola eliminar del intestino pues no se detectaron niveles de la bacteria el segundo día tras la inoculación. Por otro lado, observamos que la DO no altera esta capacidad de resistencia a la colonización por *E. coli* ya que no se detectaron UFCs de la bacteria inoculada al cultivar las heces de los ratones en el medios selectivo con cloranfenicol (Figura R30).

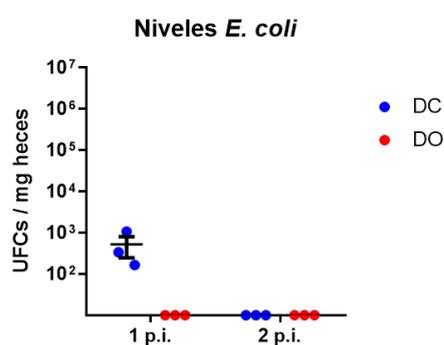


Figura R30. La dieta occidental no favorece la colonización por *E. coli*. La capacidad de colonización intestinal de *E. coli* fue medida mediante el número de UFCs detectadas en las heces de los ratones 24 y 48 h tras la inoculación de la cepa de *E. coli* CU9. Cada punto representa un único ratón.

A la vista de los resultados obtenidos, y dado que en nuestro laboratorio trabajamos también con enterococo resistente a vancomicina (VRE), otro patógeno oportunista multirresistente de gran relevancia en las infecciones hospitalarias y que

también codifica resistencia a antibióticos en plásmidos conjugativos que podrían ser transferibles, decidimos testar el efecto de la dieta en la colonización de este patógeno. Estudios previos del grupo habían evidenciado que, tras un tratamiento antibiótico, los ratones perdían su resistencia original a la colonización frente al patógeno (Figura R31) por lo que podría ocurrir que, un tipo diferente de perturbación intestinal, como es el cambio de dieta, tuviese algún efecto en la colonización por VRE.

Al evaluar los niveles de colonización de VRE en ratones alimentados durante 8 semanas con DO pudimos constatar que, en este caso, sí que existen diferencias significativas en cuanto a la colonización con respecto a los ratones que siguen una DC. La mayoría de los ratones alimentados con DO (alrededor del 90%) fueron colonizados con VRE mientras que la bacteria no fue detectada en las heces de prácticamente ningún ratón alimentado con DC (Figura R31A). Además, gran parte de los ratones que reciben DO (26/35) presentan niveles de VRE superiores a 10^4 UFC/g, niveles que permiten la contaminación del ambiente favoreciendo la diseminación entre pacientes en las instalaciones hospitalarias (2); por el contrario, solo 2 de 27 ratones alimentados con DC alcanzaban estos niveles de VRE en las heces. Cabe destacar que los niveles de colonización alcanzados por VRE tras la DO son similares a los de los ratones tratados con estreptomycin, uno de los antibióticos testados como control, pero inferiores a los de aquellos ratones tratados con vancomicina (Figura R31B), un antibiótico capaz de eliminar la mayor parte de las bacterias comensales y que permite la colonización de VRE en niveles similares a los que se alcanzan en ratones GF (ratones que carecen de microbiota).

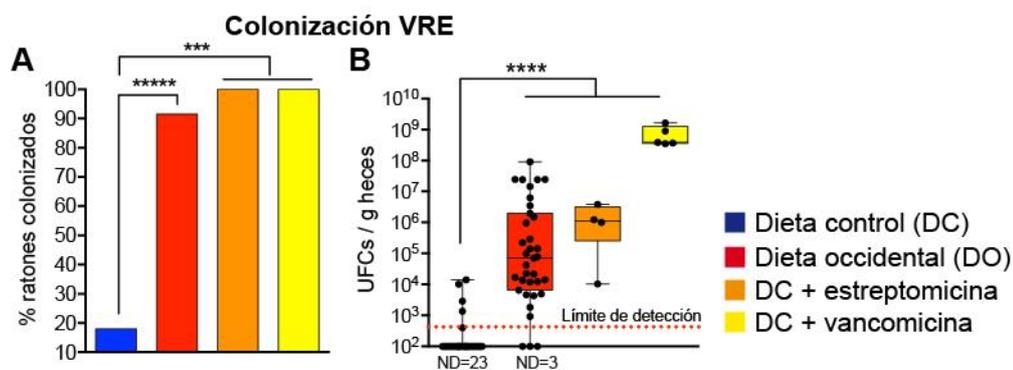


Figura R31. La dieta occidental favorece la colonización por VRE. Los ratones fueron alimentados con DO o DC durante 8 semanas previamente a la inoculación oral con 10^6 UFC de VRE (métodos, Figura M13A). En comparación tenemos ratones alimentados con DC que recibieron un tratamiento antibiótico con estreptomicina o vancomicina durante una semana antes de la inoculación de VRE. **(A)** % de ratones colonizados por VRE. **(B)** Niveles de colonización de VRE detectados en las heces recogidas 2 días post inoculación del patógeno. N grupo DC= 27; N grupo DO= 35; N grupo estreptomicina= 5; N grupo vancomicina= 5. Los rectángulos se extienden desde el percentil 25 al 75, la línea interior del rectángulo representa la mediana y el final de las líneas verticales indican el mínimo y el máximo. Cada punto representa datos de un único ratón. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Análisis estadísticos aplicados (A) test de Fisher; (B) test de Wilcoxon. ND= No detectado.

Dado que parece que la DO favorece la colonización por VRE, pensamos que quizás esta expansión de VRE podría venir asociada con un aumento en la diseminación de plásmidos de resistencia a antibióticos en los ratones alimentados con este tipo de dieta. Desafortunadamente, las cepas y condiciones de las que se disponía en ese momento no posibilitaban el estudio de diseminación de EGM entre cepas de VRE; sin embargo, los resultados obtenidos (colonización intestinal por VRE en ratones alimentados con DO, sin tratamiento antibiótico) nos parecieron lo suficientemente relevantes como para continuar investigando más en profundidad el efecto de la dieta sobre la colonización con VRE.

4.3.2. Cambios en la microbiota intestinal debidos a la alimentación con dieta occidental

La DO está cada vez más extendida y es cada vez más consumida en los países desarrollados, existiendo estudios que demuestran que induce cambios en la microbiota intestinal (11), por lo que parece interesante ahondar en su efecto sobre la colonización con VRE. Además, estamos hablando de un patógeno multirresistente de gran relevancia en infecciones hospitalarias a nivel mundial. Por estudios existentes previos al desarrollo de este trabajo, se sabe que los tratamientos antibióticos promueven la colonización intestinal con VRE, sin embargo, se desconoce que la dieta, en ausencia de antibióticos, sea suficiente para permitir su colonización intestinal. Un resultado muy relevante que quisimos investigar con más detalle.

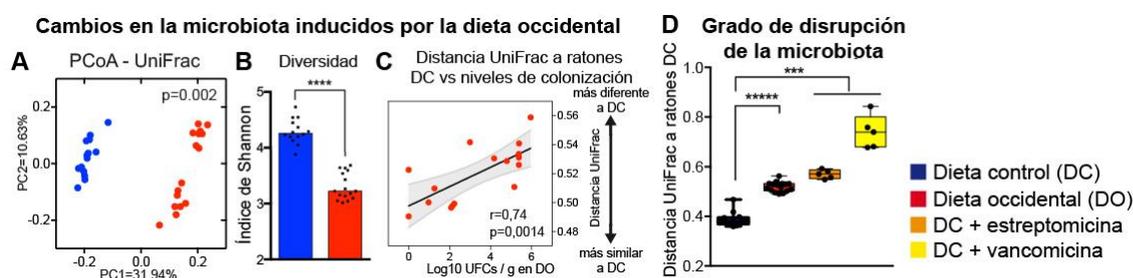


Figura R32. La dieta occidental altera la composición de la microbiota intestinal. Los ratones fueron alimentados con DO o DC durante 8 semanas previamente a la inoculación oral con 10^6 UFC de VRE. En comparación tenemos ratones alimentados con DC que recibieron un tratamiento antibiótico con estreptomicina o vancomicina durante una semana antes de la inoculación de VRE. **(A,B)** Diferencias significativas en la microbiota entre ratones alimentados con DC o DO el día de la inoculación con VRE. N grupo DC= 14; N grupo DO= 16. **(A)** Análisis de Coordenadas Principales basado en la distancia unweighted UniFrac. **(B)** Diversidad microbiana medida mediante el índice de Shannon. **(C)** Análisis de correlación de Spearman entre los cambios en la microbiota inducidos por la DO (distancia UniFrac al grupo DC) y la capacidad de colonización por VRE (UFCs en heces el segundo día post inoculación del patógeno). N=16. Se indica tanto el coeficiente de correlación (r) como el p valor en la figura. **(D)** La disrupción general de la microbiota se analiza observando la Distancia UniFrac a ratones alimentados con DC que no recibieron antibiótico. N grupo DC= 14; N grupo DO= 16; N grupo estreptomicina= 5; N grupo vancomicina= 5. Los rectángulos se extienden desde el percentil 25 al 75, la línea interior del rectángulo representa la mediana y el final de las líneas verticales indican el mínimo y el máximo. Cada punto representa datos de un único ratón. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; Análisis estadísticos aplicados (A)PERMANOVA; (B,D) test de Wilcoxon.

El primer paso en nuestro estudio consistió en evaluar si el hecho de que la DO favorezca la colonización de VRE está relacionado con una disrupción de la microbiota intestinal. El análisis de las heces procedentes de ratones alimentados con DC y DO mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA nos permitió confirmar que la DO induce cambios en la estructura global de la microbiota (Figura R32A). Para ello calculamos la distancia UniFrac como medida de diferencia entre la microbiota de dos muestras (métodos, apartado 3.17.2.) y representamos esta distancia mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Al representar la distancia Unifrac entre los ratones de los distintos grupos mediante un PCoA, se puede observar como la primera coordenada, que explica cerca del 32 % de las diferencias encontradas entre los grupos, divide las muestras en función de la dieta que han consumido. En este tipo de gráficos, cuanto más cercanas están las muestras, mayor es su similitud en cuanto a composición microbiana, por lo que se observa claramente como la DO cambia la microbiota intestinal de los ratones que la consumen. Además, también detectamos que la DO produce una disminución significativa de la diversidad bacteriana (Figura R32B) medida mediante el índice de diversidad Shannon (métodos, apartado 3.17.1). Estos datos indicaban que la dieta occidental promovía alteraciones en la microbiota intestinal y sugerían que las alteraciones en la microbiota facilitan la colonización del patógeno. Cabe destacar, tal y como se aprecia en la Figura 31B, que no todos los ratones que reciben una DO son colonizados por mismos niveles de VRE. Además, también encontramos cierta variabilidad en los cambios globales inducidos por la DO en la microbiota (dispersión de puntos rojos que se observa en la figura R32A). Estos resultados nos hicieron plantearnos que la DO podría producir un grado distinto de disbiosis en distintos ratones y que el grado de disbiosis podría estar asociado a la capacidad de VRE de colonizar el intestino. En otras palabras, aquellos ratones donde las alteraciones producidas por la dieta son mayores, corresponderán con los ratones donde se produce una mayor disbiosis. Con el fin de testar esta hipótesis, realizamos un análisis de correlación entre (i) el grado de disbiosis (calculado como distancia UniFrac del ratón a la media de los ratones alimentados con DC) de ratones que recibieron la dieta occidental pre-inoculación de VRE y (ii) el nivel de colonización de VRE. Como se puede observar en la figura R32C, los niveles de colonización de VRE en los ratones alimentados con la DO correlacionan positivamente con el grado de

disrupción de la microbiota intestinal de modo que, a mayores cambios encontrados en la composición de la microbiota en comparación a un ratón alimentado con DC, mayores son los niveles de patógeno detectados en las heces.

Por otro lado, si comparamos el grado de disrupción de la microbiota producido por la dieta occidental con el producido tras el tratamiento con los antibióticos, observamos que el grado de disrupción producido por la DO es similar al que se produce tras el tratamiento con estreptomycin, mientras que la disrupción producida por vancomicina es mayor, lo cual concuerda con la capacidad de VRE de colonización intestinal que observamos tras la DO o tras el tratamiento con estos dos antibióticos (Figura R32D).

4.3.3. Persistencia de los cambios inducidos por la DO en la microbiota

Una vez corroborado el hecho de que la DO induce cambios en la microbiota nos planteamos si dichos cambios eran permanentes o reversibles. Para ello utilizamos un modelo de ratón en el que tras las 8 semanas de DO los ratones vuelven a ser alimentados con DC durante 2 semanas más (métodos, Figura M13B), de modo que dejamos que su microbiota se recupere. Pasado este tiempo se recogen heces para analizar la composición microbiana y se colonizan estos ratones con VRE para analizar su capacidad de resistencia a la colonización.

Como se puede observar en la Figura R33A, el porcentaje de ratones colonizados por VRE tras dejar a la microbiota recuperarse durante 2 semanas (DO → DC) es significativamente menor que el de los ratones alimentados con DO y no difiere de los ratones alimentados con DC. Además, los niveles de VRE detectados en las heces son similares para los ratones alimentados con DC durante 8 semanas y para los que, tras una dieta occidental, reciben DC durante 2 semanas (DO → DC). Sin embargo, los niveles de VRE en los ratones que recibieron la DO eran significativamente más elevados en comparación con los otros dos grupos (Figura R33B). Este resultado nos indica que la vuelta a una DC es suficiente para restaurar la resistencia a la colonización en la mayoría de los ratones. El estudio de la heces mediante secuenciación masiva muestra nuevamente que la DO altera considerablemente la

composición de la microbiota pero que ésta se recupera parcialmente tanto a nivel global como a nivel de diversidad bacteriana (Figura R33C y D) tras administrar DC durante 2 semanas.

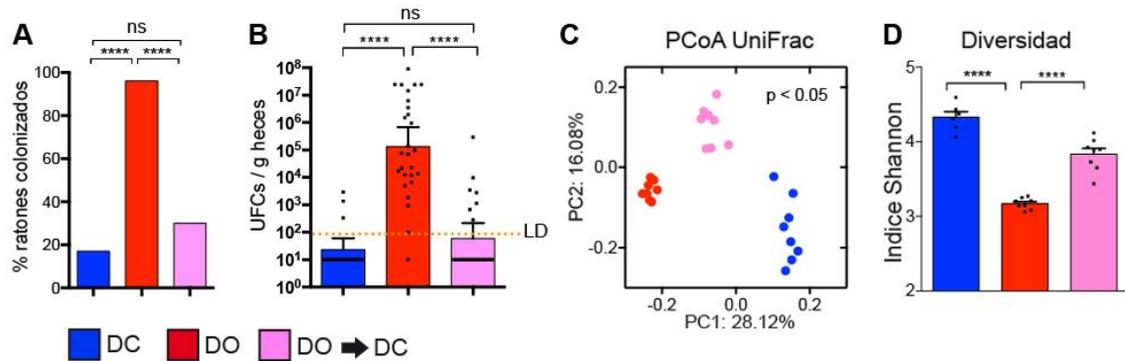


Figura R33. Cambios en la microbiota y capacidad de colonización de VRE tras 2 semanas de recuperación con DC. Los ratones fueron alimentados durante 8 semanas con una DC o una DO. Posteriormente se obtuvo una muestra fecal para el análisis de la microbiota y seguidamente se inocularon vía oral con 10⁶ UFCs de VRE. 2 días tras la inoculación se analizaron los niveles de VRE en heces. En otro grupo de ratones se administró una DO durante 8 semanas y posteriormente se administró una DC durante 2 semanas antes de ser inoculados por VRE. **(A)** % de ratones colonizados por VRE. **(B)** Niveles de colonización de VRE detectados en las heces dos días post-inoculación con VRE. **(C)** Diferencias globales en la microbiota de los ratones analizados mediante un análisis de coordenadas principales utilizando la distancia UniFrac. p valor < 0,05 **(D)** Diversidad total de la microbiota de los distintos grupos medida con el índice de Shannon. N grupo DC= 17; N grupo DO=27; N grupo DO-DC= 23. **** p<0,0001. Análisis estadísticos aplicados (A) test de Fischer; (B,D) test de Wilcoxon. LD= límite de detección. Aquellos ratones en los que no se detectó VRE se les asignó un valor de 10 UFC en el panel B. Cada punto representa un único ratón.

Al realizar un análisis más profundo sobre aquellos taxones concretos que se modifican durante los cambios de dieta podemos apreciar que la administración de DO tiene un efecto diferente según los géneros analizados. Bacterias como *Acetalifactor*, *Akkermansia*, *Hydrogenoanaerobacterium*, *Prevotella* o *Clostridium* sensu estricto sufren una expansión en aquellos ratones alimentados con DO, sin embargo, sus niveles vuelven a disminuir cuando los ratones dejan de ser alimentados con esa dieta (Figura R34A).

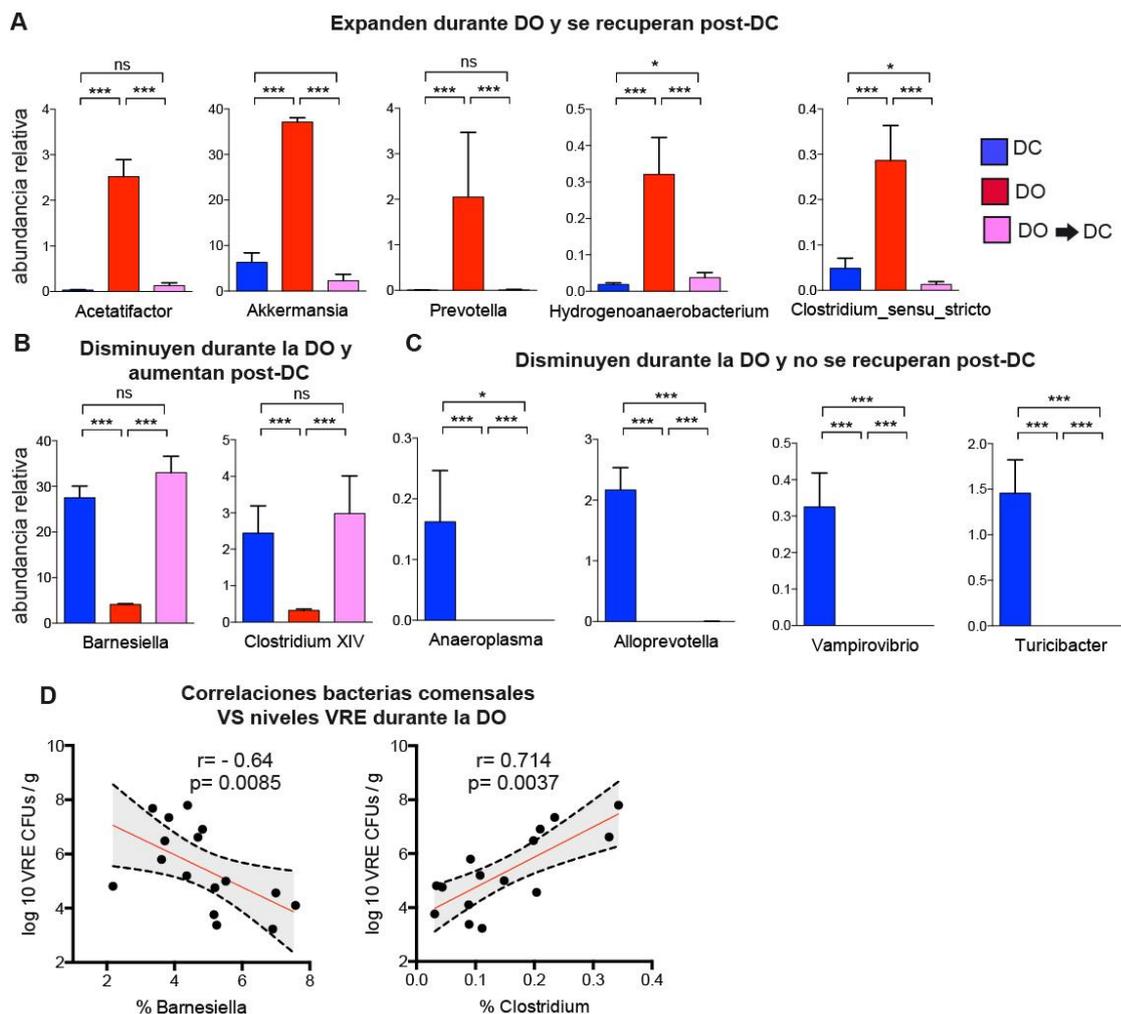


Figura R34. Cambios en la microbiota producidos por la DO y su posible efecto en la colonización por VRE. (A-C) Géneros cuya abundancia difiere significativamente entre ratones que recibieron una DO y aquellos que recibieron DC (test de Wilcoxon test $q < 0,05$; $\log_2FC > |2|$). Tan solo aquellos géneros más abundantes se indican en la figura (abundancia media en alguno de los dos grupos $> 0,1\%$; presencia en $>50\%$ de los ratones en uno de los 2 grupos). En la figura también se muestra la abundancia de dichos géneros en ratones que recibieron una DC después de recibir una DO. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ^{ns} $p > 0,05$. **(D)** Correlación de Spearman entre los niveles fecales de VRE durante la DO y la abundancia relativa de bacterias indicadas en los paneles (A-B). Tan solo se muestran las correlaciones significativas ($q < 0,05$).

Otras bacterias, en cambio, ven disminuida su abundancia relativa con la DO. Es el caso de *Barnesiella* y *Clostridium XIV*; sin embargo, los niveles de estas bacterias se recuperan totalmente al alimentar de nuevo a los ratones con DC (Figura R34B). Estas bacterias podrían ejercer un papel importante en la resistencia de la microbiota frente a la colonización por VRE pues, de igual modo que su abundancia relativa se recupera con el cambio de dieta, se recupera simultáneamente la resistencia a la colonización

por el patógeno. No obstante, encontramos también otras bacterias como *Anaeroplasma*, *Alloprevotella*, *Vampirovibrio* y *Turicibacter* cuya abundancia relativa disminuye durante la DO y no se recupera tras dos semanas de alimentación con DC (Figura R34C) probablemente porque dichas bacterias hayan sido totalmente eliminadas del intestino durante la administración de la DO, lo que nos muestra que ciertos cambios en la microbiota producidos por la DO pueden ser irreversibles.

Con el fin de detectar cambios en bacterias comensales inducidos por la DO que pudieran estar relacionados con la colonización intestinal de VRE, realizamos una correlación entre la abundancia relativa de aquellas bacterias que sufren modificaciones durante la DO y los niveles fecales de VRE detectados en los ratones alimentados con DO. Cabe destacar que identificamos un par de géneros cuya correlación con VRE era significativa: *Barnesiella* y *Clostridium*. Este resultado indica que la variabilidad en los niveles de colonización detectados en ratones alimentados con DO podría asociarse con diferentes cambios en la microbiota. Los ratones con una mayor abundancia de *Barnesiella* parecen ser más resistente a VRE durante la DO y lo contrario sucede con *Clostridium* (Figura R34D). Estos resultados sugerían que *Barnesiella* pudiera tener un papel protector frente a VRE, de hecho, estudios previos de nuestro grupo habían identificado una asociación entre la presencia de *Barnesiella* y la resistencia a la colonización por VRE tanto en ratones tratados con antibióticos como en pacientes hospitalizados (20) . Por otro lado, los análisis realizados sugerían que *Clostridium* pudiera tener un papel promotor de la colonización intestinal de VRE.

4.3.4. Heredabilidad de los cambios inducidos por la DO en la microbiota

Diversos estudios han mostrado que el tracto intestinal de las crías de mamífero comienza a colonizarse con la microbiota materna, fecal y vaginal, con la que entra en contacto durante el momento del parto (172), y posteriormente a través de la leche materna, de modo que las bacterias de la madre pueden ser heredadas. Por otro lado, existen estudios (11) que señalan que los cambios que produce la DO, algunos de los cuales son inicialmente reversibles, se vuelven irreversibles con el paso de las generaciones. Por eso, esperaríamos que las crías de madres alimentadas con DO

tuviesen menor resistencia a la colonización que las crías de ratones alimentados con DC independientemente del tipo de dieta recibida tras el destete.

Con el objetivo de clarificar la persistencia de los cambios detectados en la microbiota tras el consumo de la DO, algunas de las crías descendientes de madres que fueron alimentadas con DO fueron mantenidas en este tipo de dieta, la misma que comían sus madres, mientras que a otras se les alimentó desde el momento del destete con DC durante 8 semanas (métodos, Figura M13C). Pasado este tiempo estudiamos la resistencia a la colonización por VRE y la composición microbiana de todos estos ratones. Como control también analizamos la composición de la microbiota y la resistencia a la colonización por VRE en ratones descendientes de madres alimentadas con una DC.

Cabe señalar la dificultad encontrada para obtener crías a partir de madres alimentadas con DO. Hemos detectado que las hembras quedaban preñadas y parían a sus crías sin diferencias con las hembras de DC, sin embargo, por algún motivo que desconocemos, las madres alimentadas con DO mataban a las crías y muy pocas lograron sobrevivir hasta el día del destete lo que ha limitado el número de ratones por grupo que han podido ser analizados (N=3).

Aunque el reducido tamaño muestral obtenido tras 12 cruces no nos permite aplicar test estadísticos, la tendencia de los resultados muestra claramente como los niveles de colonización de VRE en las crías alimentadas con la misma dieta que sus madres reproduce los valores que conocíamos hasta la fecha. Es decir, no se observa colonización de VRE en aquellos ratones alimentados con DC, independientemente de la alimentación que recibió la madre. Sin embargo, la resistencia a la colonización por VRE se pierde en aquellos ratones alimentados con DO que provenían de madres que habían sido alimentadas con DO (Figura R35). Curiosamente, las crías de madres alimentadas con DO que tras el destete han recibido DC, además de recuperar la resistencia a la colonización por el patógeno (Figura R35A), también recuperan de forma parcial su microbiota (Figura R35B y C). En el análisis de coordenadas principales realizado se puede apreciar que la primera coordenada principal, que explica un 50% de la variabilidad existente, separa a los ratones según la dieta que estén tomando,

independientemente de la dieta que tomaron sus madres (Figura R35B). Por otro lado, cuando analizamos la diversidad bacteriana, observamos que parece haber una recuperación parcial de la diversidad en 2 de los 3 ratones alimentados con una DC y descendientes de madres que recibieron una DO. Estos resultados sugieren que los ratones de madres que tomaron la DO recuperan, aunque solo parcialmente, su microbiota al administrarse una DC. Estos resultados están en concordancia con artículos previamente publicados (11) que afirman que algunos de los cambios producidos por la DO en la microbiota intestinal persisten en la descendencia, aunque se les vuelva a administrar una DC. Sin embargo, parece que esta recuperación parcial es suficiente para restaurar la resistencia a la colonización por el patógeno.

Si analizamos de forma más detallada las bacterias de estos ratones podemos ver el mismo comportamiento que ya habíamos detectado para algunos géneros anteriormente. *Alloprevotella* y *Vampirovibrio* desaparecen en los ratones alimentados con DO y no se recuperan los niveles (cambio permanente) aunque la descendencia sea alimentada con DC probablemente porque las bacterias han sido eliminadas por completo del intestino (Figura R35D). Por otro lado, *Barnesiella* disminuye su abundancia relativa en los ratones alimentados con DO, mientras que los niveles de *Clostridium* aumentan. Curiosamente, en aquellos ratones descendientes de madres alimentadas con DO pero que han recibido DC desde su destete, ambas bacterias recuperan niveles similares a los encontrados en los ratones alimentados con DC sugiriendo que los cambios en estas bacterias concretas son reversibles (Figura R35D).

En general, los resultados de esta figura indican que la microbiota de la descendencia de madres que fueron alimentadas con una DO es capaz de recuperarse parcialmente si se les administra una DC. Esta recuperación, aunque tan solo parcial, parece ser suficiente para proporcionar resistencia a la colonización por VRE.

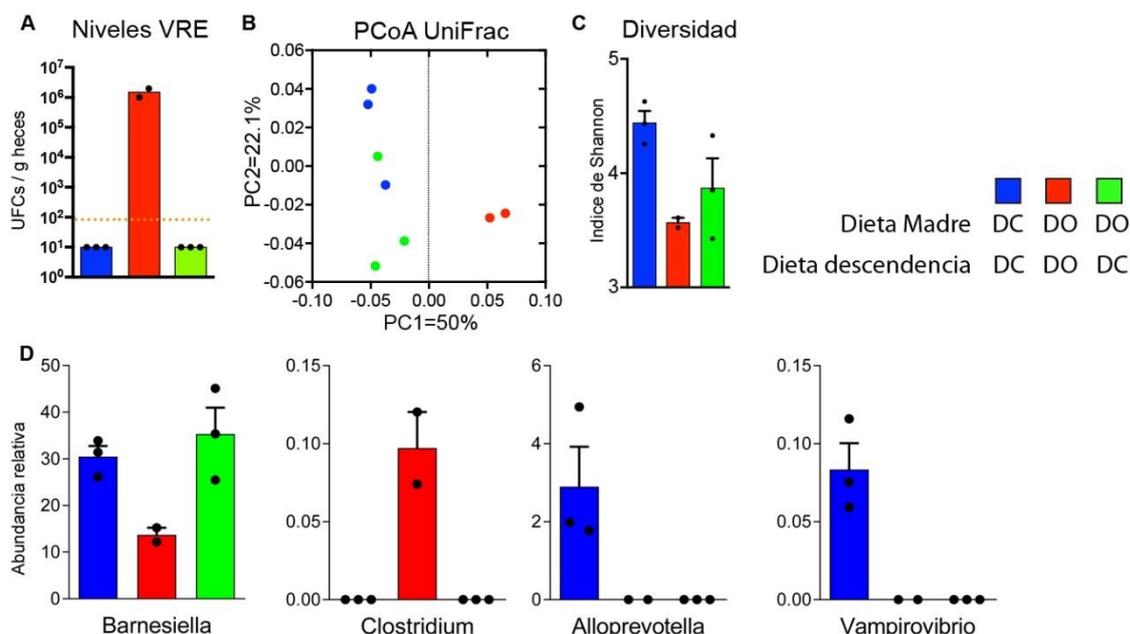


Figura R35. Cambios en la microbiota y capacidad de colonización de VRE en la descendencia de ratones alimentados con DC o DO. La descendencia de ratonas alimentadas con DC o DO fue, tras el destete, alimentada con DC o DO (la leyenda de colores indica para cada grupo de ratones, tanto la dieta que recibieron tras el destete como la dieta que recibieron sus madres). A las 8 semanas de edad se analizó la microbiota de los ratones, se inocularon de forma oral con 10⁶ UFC de VRE y se analizaron los niveles de patógeno detectados en heces. **(A)** Niveles de VRE en heces 2 días tras la inoculación. **(B)** Diferencias de la microbiota a nivel global analizadas mediante un análisis de coordenadas principales utilizando la distancia UniFrac. **(C)** Diversidad de la microbiota medida mediante el índice de Shannon. **(D)** Abundancia relativa de distintos géneros bacterianos detectados en las heces en ratones descendientes de madres alimentadas con DO o DC previo a la inoculación de VRE. Cada punto representa datos de un único ratón. Tenemos tres grupos de ratones: los descendientes de madres alimentadas con DC que continúan esa misma dieta tras el destete (N=3), los descendientes de madres alimentadas con DO que recibieron DO (N=2) y los descendientes de madres alimentadas con DO que recibieron DC (N=3).

4.3.5. Efecto de la restauración microbiana mediante trasplante fecal en la resistencia a la colonización por VRE

Con los datos obtenidos hasta el momento, nuestro trabajo parece indicar que son necesarios ciertos cambios en la microbiota causados por la DO para que VRE pueda colonizar el intestino de los ratones. Para corroborar esta hipótesis y eliminar el efecto directo de la dieta sobre el crecimiento de VRE se puso a punto un modelo de ratón diferente en el que, ratones alimentados con DC reciben un tratamiento

antibiótico que elimina casi en su totalidad la microbiota intestinal (21) (métodos, apartado 3.13.3) y se restaura su microbiota con bacterias procedentes de ratones alimentados con DC o DO durante 8 semanas (métodos, Figura M13D) (Figura R36A). La ventaja que pensamos que puede tener este modelo es que se transfieren principalmente aquellas bacterias que han expandido durante la DO, mientras que las que se encuentren en baja abundancia, como por ejemplo reservorios presentes en criptas intestinales tendrán una mayor dificultad para transferirse y por tanto para expandir con la administración de DC. De esta manera esperamos poder mantener la disbiosis inducida por la DO en ausencia de este tipo de dieta.

En primer lugar, verificamos que la microbiota de los ratones trasplantados se parecía a la de sus donantes (Figura R36B). Posteriormente evaluamos la capacidad de colonización de VRE en los ratones trasplantados con las respectivas microbiotas. Cabe destacar que los ratones trasplantados con una microbiota procedente de ratones alimentados con DO son más susceptibles a la colonización por VRE, aunque se alimenten con DC, que aquellos trasplantados con una microbiota procedente de ratones alimentados con DC (Figura R36C). Este resultado nos indica que los cambios en la microbiota producidos por la DO son relevantes para que VRE colonice el intestino.

El análisis del 16s rRNA en más detalle reveló la misma tendencia que hemos estado observando en el resto de los modelos: los ratones con una microbiota restaurada proveniente de ratones alimentados con DO tienen una menor diversidad microbiana (Figura R36D) que aquellos restaurados con microbiota DC. Además, presentan menores niveles de *Barnesiella* y mayores niveles de *Clostridium* (Figura R36E), en línea con el posible papel de estas bacterias como protectoras o potenciadoras respectivamente de la colonización por VRE.

Estos resultados sugieren que los cambios en la microbiota inducidos por la DO tienen un efecto en la colonización por VRE independiente de la dieta administrada al ratón.

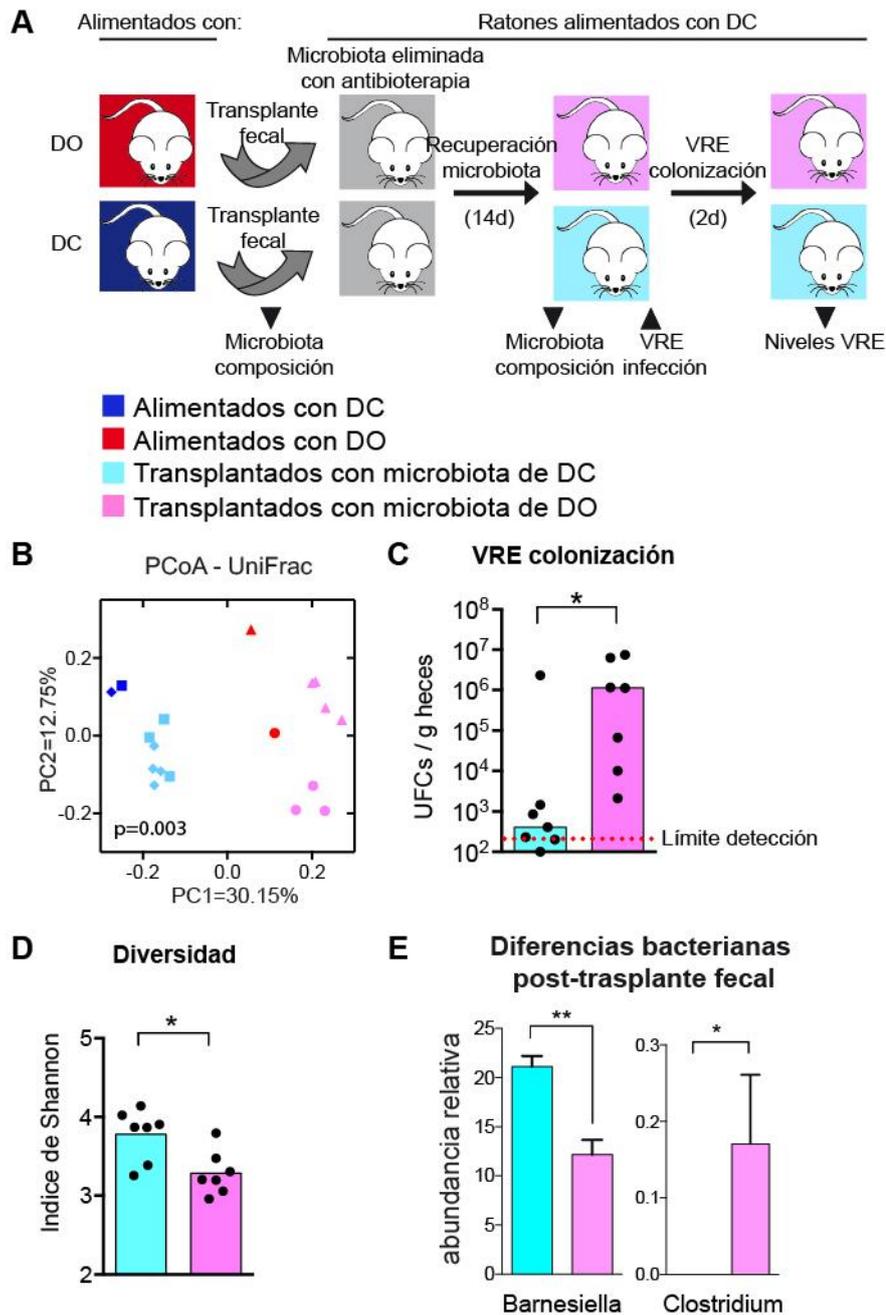


Figura R36. Restauración de la microbiota y resistencia a la colonización por VRE tras el trasplante fecal. (A) Esquema del modelo de ratón empleado en el experimento. La microbiota de ratones alimentados con DC fue eliminada mediante una terapia antibiótica extensiva, tal y como se ha publicado previamente (21) y posteriormente reconstituída con heces obtenidas de ratones que fueron alimentados durante 8 semanas con una DC o DO. Dos semanas tras administrar el trasplante fecal, se analizó la microbiota de los ratones trasplantados y se inocularon vía oral con 10^6 UFC de VRE. (B) Análisis de coordinadas principales mostrando las diferencias globales en la composición de la microbiota. Los ratones trasplantados (colores claros) o las heces utilizadas para realizar el trasplante fecal (colores oscuros). La forma del símbolo indica los ratones que recibieron el mismo trasplante fecal. (C) Niveles de colonización del patógeno dos días después de la inoculación, medidos como UFC de VRE detectadas por gramo de heces. (D) Diversidad microbiana de los ratones trasplantados. (E) Abundancia

relativa de los géneros *Barnesiella* y *Clostridium* en ratones trasplantados con heces de ratones alimentados con DC o DO. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$ test de Wilcoxon. Cada punto representa datos de un único ratón.

Todos los datos obtenidos en este estudio demuestran que el consumo de dieta occidental induce cambios relevantes en la microbiota intestinal, algunos de ellos reversibles pero otros permanentes, que favorecen la colonización por VRE. Cabe destacar la detección de los géneros *Barnesiella* y *Clostridium* como especialmente asociados con los niveles intestinales de patógeno. Con el fin de testar el posible efecto protector de *Barnesiella* frente a VRE, estudios realizados por otros miembros de nuestro grupo de investigación trataron ratones con vancomicina y tras detener el tratamiento antibiótico se inoculó *Barnesiella* (aislada de estudios previos) o PBS a los ratones. Tras dos semanas de recuperación de la microbiota se testó la capacidad de colonización de VRE. Los resultados mostraron una mayor resistencia a la colonización de los ratones que reciben *Barnesiella* frente a los que reciben PBS sugiriendo un efecto protector de esta bacteria (resultado no mostrado ya que es pertinente a otro estudio distinto a esta tesis). Por otro lado, el efecto de *Clostridium* no se ha podido testar ya que no hemos podido aislar aun una cepa de *Clostridium* del intestino de ratones.

5. Discusión

5.1. Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

5.1.1. Proceso de diseño y construcción de una herramienta para estudiar diseminación de plásmidos a través de la detección de fluorescencia.

Hay un gran número de estudios realizados sobre la diseminación de elementos genéticos móviles, más concretamente plásmidos conjugativos en el intestino, pero en la mayoría de ellos se recurre al cultivo de las bacterias en medio selectivo para la detección de transconjugantes (TC) (173-175). Sin embargo, el resultado de estos estudios viene siempre limitado por la dificultad de cultivo y detección de una fracción considerable de bacterias intestinales que son muy difícilmente cultivables en condiciones de laboratorio. Por este motivo, metodologías que permitan la detección de las bacterias sin necesidad de recurrir a su crecimiento tienen un elevado potencial en este campo de estudio.

En este sentido, Klümper y colaboradores (6) diseñaron una metodología en la que los plásmidos conjugativos se encuentran marcados con la proteína fluorescente GFP, lo que permite detectar las bacterias TC mediante citometría de flujo, separarlas y secuenciar el gen 16S rRNA para su identificación sin recurrir al cultivo bacteriano. Para poder separar fácilmente las bacterias donadoras de las TC, las primeras contenían en su genoma un marcador que expresaba fluorescencia en una longitud de onda diferente (*mcherry*) y un represor que inhibe la expresión del gen de fluorescencia *gfp* del plásmido conjugativo. Así pues, esta estrategia les permitió realizar un estudio menos sesgado del potencial de diseminación de EGM propios de enterobacterias entre la microbiota del suelo. En nuestro caso, decidimos adaptar esta metodología para nuestro objetivo del estudio de la diseminación de EGM en la microbiota intestinal, por parecernos que los resultados obtenidos de esta forma podrían aportar un mayor conocimiento sobre la dinámica real que siguen estos plásmidos en el ambiente intestinal. Sin embargo, el principal inconveniente que encontramos para la implementación de esta metodología residía en la necesidad de oxígeno para la emisión de fluorescencia por parte de la proteína GFP, siendo el ambiente intestinal principalmente anaeróbico. Por ello, testamos inicialmente la expresión del gen *ytvA*,

que codifica la proteína FbFP con capacidad descrita para emitir fluorescencia tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (7).

Así, nuestra construcción inicial constaba del mismo promotor sintético PA1/04/03 utilizado para el estudio de diseminación de EGM en la microbiota de suelo, regulando el gen que codifica para la proteína fluorescente FbFP. Sin embargo, la fluorescencia que obteníamos con estas construcciones en el plásmido conjugativo en condiciones anaeróbicas era considerablemente inferior a la que se obtenía tras el cultivo de las bacterias en presencia de oxígeno, hasta el punto de impedirnos diferenciar la señal emitida por la proteína fluorescente de la autofluorescencia propia de las bacterias de la microbiota intestinal (Resultados, apartado 4.1.1.1., figura R3). El hecho de que la señal fluorescente del plásmido pGLOW, que contiene el gen *ytvA* bajo la acción del promotor T7, fuese similar tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas sugiere que no estamos ante un problema de estabilidad o requerimiento de oxígeno de la proteína sintetizada para poder plegarse de manera adecuada, como ocurre con la proteína GFP, sino que parece estar más relacionado con el promotor que regula dicha expresión.

Sabemos que muchos genes bacterianos difieren en su expresión en función de las concentraciones de oxígeno ambientales, especialmente en aquellas bacterias que son anaerobias facultativas y pueden pasar de un metabolismo aeróbico a uno anaeróbico. Los avances en genómica funcional de las últimas décadas han permitido la utilización de técnicas para hacer “*screening*” a gran escala como es el caso de los microarrays utilizados por Ye y colaboradores para el estudio de los patrones de expresión de más de 4000 genes de *Bacillus subtilis* (176) tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, mostrando la existencia de cientos de genes con modificaciones importantes en su expresión. Además, estos genes no estaban exclusivamente ligados al metabolismo de la bacteria, sino que eran genes involucrados en gran variedad de funciones celulares como transporte de electrones, consumo de hierro, producción de antibióticos, respuesta al estrés y otros con funciones todavía desconocidas regulados entre otros por los reguladores ResDe y FNR. Estos datos sugieren que estos reguladores son capaces de reaccionar a los niveles de oxígeno modificando la acción de numerosos promotores. Otros

promotores que se han descrito como inducibles según las concentraciones de oxígeno son el promotor *nar* de *E.coli* (pNW618), cuya actividad es totalmente suprimida en presencia de oxígeno y maximizada en condiciones anaeróbicas (177), y el promotor *soxS*, que puede aumentar hasta 16 veces la expresión de los genes que le siguen en presencia de altas concentraciones de oxígeno (178).

Podrían haberse realizado diversos estudios con el fin de establecer si existe algún tipo de influencia de la concentración de oxígeno en la actividad del promotor que testamos. El primero y más sencillo sería cuantificar la cantidad de ARNm producido, para este u otro gen expresado bajo la acción del promotor Plac, bajo diferentes concentraciones de oxígeno que abarquen los rangos de anaerobiosis, microaerobiosis y aerobiosis. Por otro lado, estudios genéticos comparativos entre nuestro promotor y los promotores descritos como inducibles por los niveles de oxígeno podrían poner de manifiesto estructuras comunes que fuesen claves para esta regulación, al igual que ocurre con el promotor *lacI*, que presenta una región de unión para catabolitos con una fuerte homología a la presente en el promotor del gen *VHb*, inducible según la concentración de oxígeno disponible en el medio (179). Sin embargo, debido a que este estudio se alejaba considerablemente de los objetivos de nuestro proyecto, no se estudió en más detalle, sino que optamos por cambiar el promotor de la construcción.

El promotor que fuese seleccionado para nuestra construcción debería cumplir ciertos requisitos: (i) presentar una amplia actividad tanto en bacterias gram positivas como gram negativas, (ii) existir un represor descrito para dicho promotor que nos permitiera anular la señal fluorescente en las células donadoras y (iii) no estar condicionado por los niveles de oxígeno del ambiente. A pesar de haber alcanzado altos niveles de expresión de la proteína fluorescente FbFP en condiciones anaeróbicas bajo la acción del promotor T7 (el promotor presente en pGLOW), este promotor no es reprimible por un represor constitutivo y no está descrita su utilización para ser expresado en un amplio rango de bacterias, por lo que no podía ser seleccionado para formar parte de nuestra construcción. Se testaron 3 promotores diferentes que cumplían estos requisitos, Pro, Ptet y Ptet2, con los que se alcanzaban mayores niveles de fluorescencia en anaerobiosis al testar la construcción en el plásmido vector. Sin

embargo, al pasar la construcción a los plásmidos conjugativos, que se encuentran en un menor número de copias en las células, los niveles no eran lo suficientemente altos como para poder distinguir la fluorescencia proveniente de la proteína FbFP de la autofluorescencia de la muestra fecal (Resultados, apartado 4.1.1.1., figura R5).

En lo referente a la fluorescencia de la muestra intestinal, se barajaban diferentes hipótesis sobre su origen. La fluorescencia puede ser debida a restos de nutrientes o partículas en suspensión del medio intestinal con un tamaño similar al de las bacterias o a la emisión de autofluorescencia por ciertos grupos de bacterias intestinales. Para intentar averiguar de dónde procedía dicha fluorescencia se utilizaron diferentes estrategias de purificación de las bacterias fecales que no han sido descritas en esta tesis. Por un lado, se purificaron las bacterias utilizando Histodenz (Sigma), un compuesto no iónico diseñado para la separación de moléculas mediante centrifugación por gradiente de densidades. También se fijaron las bacterias con paraformaldehído y se tiñó su ADN utilizando Syto (Fisher), de modo que podríamos seleccionar la visualización por citometría exclusivamente de aquellos eventos marcados con el fluoróforo, es decir, aquellas partículas con ADN en su interior, eliminando todo aquello que, aunque pudiese tener un tamaño similar, no fueran bacterias. Sin embargo, ninguna de estas estrategias consiguió eliminar la señal fluorescente que solapa con la de la proteína FbFP, lo que sugiere que la fluorescencia debe de proceder de las propias bacterias intestinales.

Este mismo problema de autofluorescencia de ciertos grupos bacterianos de la microbiota intestinal ha sido también descrito por otros grupos de investigación. En 2019, Denu y colaboradores publicaron un estudio en el que observaban como ratones C57BL/6 poseen microorganismos intestinales que emiten fluorescencia en 7 de los 16 canales testados, variando ésta dependiendo de la dieta con la que fueron alimentados (180). Al parecer, la clorofila presente en la alfalfa promovería la autofluorescencia de la microbiota intestinal. El paso de los ratones a una dieta sin alfalfa permitió visualizar una pérdida de la señal fluorescente al día siguiente del cambio de alimentación, sin verse alterada la estructura general ni la composición de la microbiota (180). Esta información sugiere que quizás un cambio en la dieta suministrada a nuestros ratones podría haber mejorado los problemas de detección de autofluorescencia.

Recientemente, Galbusera y colaboradores han creado un paquete de herramientas de libre acceso llamadas E-Flow (<https://github.com/vanNimwegenLab/E-Flow>) que ayudan a los investigadores en el análisis de los datos mediante citometría de flujo (181). Uno de los problemas que pretende resolver esta herramienta es la eliminación de la fluorescencia basal de los cultivos proveniente bien de la autofluorescencia bacteriana o de la fluorescencia de compuestos no bacterianos como el medio del cultivo. Mediante el uso de la distribución de una población bacteriana no fluorescente utilizada como control, se obtiene una estimación de la autofluorescencia y se elimina de la media y la varianza del resto de poblaciones celulares. Además de este problema, el software afronta otras de las principales complicaciones que se presentan de manera habitual al estudiar células bacterianas utilizando citometría de flujo: (i) la diferenciación de las células bacterianas, con un tamaño muy próximo a los límites de detección del aparato, del ruido de fondo, lo cual se consigue mediante la implementación de un modelo que tiene en cuenta toda la información aportada por los ejes Forward (FSC) y Side scatter (SSC), pudiendo además obtener una estimación de la media y la varianza de la población estudiada eliminando los *outliers*; (ii) la diferenciación de las fluctuaciones naturales en la expresión génica (182) del ruido de fondo introducido por el citómetro, lo cual consigue eliminarse mediante la utilización de las perlas de calibración propias de los citómetros, calculándose posteriormente una varianza corregida.

En nuestro estudio, la determinación de la población bacteriana se realizó en dos pasos consecutivos en los que, en primer lugar, se selecciona una población en función del tamaño (FSC) y complejidad (SSC) esperada de nuestras bacterias y, en segundo lugar, se enfrenta el área y la altura de la señal fluorescente en un mismo gráfico para poder eliminar aquellas bacterias que puedan estar agregadas y distorsionar nuestros resultados. Por otro lado, el problema de las poblaciones autofluorescentes fue solucionado mediante la visualización de las células en un nuevo canal de fluorescencia (AmCyan) en el que no se detectaba señal procedente de la proteína fluorescente, mientras que sí que se detectaba señal procedente de las bacterias autofluorescentes intestinales. De este modo, se consideraron como bacterias TC únicamente aquellos eventos detectados por citometría que fueran

fluorescentes en el canal FITC y no lo fueran en el canal AmCyan. Aunque consideramos que estas estrategias han dado una solución satisfactoria a los principales problemas que genera el uso de la citometría de flujo en poblaciones bacterianas, sería muy interesante comparar los resultados tras el uso del software E-Flow e implementar estas herramientas diseñadas para la corrección de errores en nuestro protocolo de trabajo, de forma que hubiese una mayor estandarización de la metodología. De igual modo, la posibilidad de eliminar el efecto de confusión del ruido de fondo en cuanto a señal fluorescente podría permitirnos no ser tan estrictos en los umbrales marcados y poder detectar bacterias en las que la expresión de la proteína fluorescente no alcance una señal luminosa tan elevada como en *E.coli*. En el futuro, se realizarán análisis para estudiar si la aplicación de la metodología E-Flow nos permite detectar un mayor número de bacterias aceptoras de plásmidos conjugativos.

Respecto a la señal fluorescente, cabe destacar nuevamente la importancia de la elección del promotor, puesto que el funcionamiento de estos puede variar en función de los factores de transcripción que estén presentes en el ambiente celular en cada momento. Los factores de transcripción responden a señales ambientales como el pH, la temperatura, el oxígeno o los nutrientes disponibles del medio que pueden ser interpretadas de forma diferente por cada organismo. De esta forma, podemos imaginar que las mismas condiciones experimentales pueden inducir respuestas diferentes a nivel de la expresión génica en distintas bacterias. Esto sugiere que la regulación génica es un proceso multifactorial complejo y que a pesar de que los promotores seleccionados para este trabajo (Ptet y Plac) sean de amplio espectro, cabe la posibilidad de que existan bacterias de la microbiota en las que el plásmido pueda diseminarse, pero que no seamos capaces de detectar debido a que no se esté produciendo en ellas la expresión de la proteína fluorescente. Además, la presencia en la bacteria aceptora de represores naturales para los promotores con los que trabajamos podría inhibir la señal fluorescente de las células, impidiendo su detección por citometría. Esta metodología está diseñada para poder visualizar transferencia a una población bacteriana compleja como es la microbiota intestinal. En caso de interesarnos el estudio de algún grupo bacteriano más concreto, sería recomendable

adaptar la construcción según los datos disponibles para asegurar la expresión fluorescente en dichas bacterias.

De igual modo que la elección del promotor es un proceso clave, también son fundamentales los plásmidos conjugativos seleccionados para el estudio. En los últimos años se han publicado diversos trabajos en los que se estudia la tasa de transferencia de plásmidos conjugativos *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de poder detectar los principales factores que afectan a dicha transferencia e inferir lo que ocurre en los ambientes naturales como por ejemplo en el intestino, a partir de los modelos con los que se trabaja en el laboratorio. En uno de estos estudios, Benz y colaboradores testaron la transferencia de 8 plásmidos diferentes (4 pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncI y 4 pertenecientes al grupo IncF, ambos con un espectro de diseminación restringido) asociados con la diseminación clínica de betalactamasas de espectro extendido, entre diferentes cepas de *E. coli* utilizadas como donadoras y receptoras de los experimentos (173). Para los estudios *in vivo* utilizaron ratones C57BL/6 gnotobióticos, con una microbiota definida que permite la colonización por *E. coli* sin necesidad de recibir ningún tratamiento antibiótico. Los resultados obtenidos sugieren que la frecuencia de conjugación depende tanto del tipo de plásmido como de la combinación de las bacterias donante y receptora. Además, la transferencia de los plásmidos *in vivo* concordaba cualitativamente con lo obtenido previamente *in vitro*, por lo que este grupo sugiere que la diseminación de plásmidos en ambientes complejos como el intestino de animales y humanos puede ser predicha en base a datos genéticos y experimentales. Sin embargo, también en 2020, Neil y colaboradores publicaban un estudio que parecía demostrar lo contrario (174). En él, se estudiaba la transferencia de 13 plásmidos aislados de enterobacterias pertenecientes a los 10 principales grupos de incompatibilidad. Como cepa donadora y receptora se utilizó en todo momento la bacteria *E. coli* marcada con diferente resistencia a antibióticos para poder diferenciar los TC de las bacterias donadora. Los experimentos *in vitro* revelaban una variación de hasta 5 órdenes de magnitud en la frecuencia de conjugación dependiendo del plásmido utilizado. Para realizar las pruebas *in vivo* utilizaron también ratones C57BL/6, pero en este caso se trataron con 1 g/L de estreptomycin en el agua de bebida para asegurar la colonización de las

bacterias donadora y aceptora. En los resultados obtenidos por este grupo, no existe una correlación entre la transferencia observada *in vitro* e *in vivo*. Una posible explicación de los diferentes resultados obtenidos por ambos grupos podría residir en la variabilidad de plásmidos estudiados. Curiosamente, de entre todos los plásmidos testados, Neil y colaboradores encontraron que el plásmido TP114, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncI, era el que mostraba una mayor tasa de diseminación en las condiciones testadas *in vivo* muy por encima del resto, debido a un incremento de 10 veces en su tasa de conjugación en condiciones de baja concentración de oxígeno. Justamente, este plásmido pertenece al mismo grupo de incompatibilidad que 4 de los plásmidos testados por el grupo de Benz, lo que sugiere que el tipo de plásmido podría ser clave en cuanto a la diseminación en el ambiente intestinal se refiere. Una posible explicación podría ser que los plásmidos con un amplio espectro de diseminación necesitan tener una evolución de su maquinaria de conjugación más generalizada para ser aceptado en un mayor número de bacterias diferentes, en detrimento de la eficiencia con la que diseminan en comparación con un plásmido de espectro de diseminación más restringido que puede tener una evolución más adaptada a las bacterias que suelen ser sus hospedadoras. De hecho, Neil y colaboradores realizaron posteriormente un análisis genómico comparativo con el que sugieren que, debido al alto porcentaje de genes compartidos, probablemente la mayoría de plásmidos pertenecientes al grupo IncI₂ presentarán una elevada tasa de diseminación en el ambiente intestinal. En este trabajo también testaron la eficiencia del plásmido R388 (IncW), uno de los seleccionados para nuestro estudio, no pudiendo detectar conjugación en las condiciones testadas *in vivo*. Como vemos, la elección del plásmido puede ser determinante en los estudios de diseminación. En el momento de iniciar nuestro proyecto estos datos no estaban todavía publicados, de lo contrario, probablemente hubiésemos seleccionado el plásmido TP114 por presentar una buena diseminación *in vivo* a pesar de tener un espectro de diseminación más restringido, o alguno con amplio rango de diseminación con una tasa de transferencia *in vivo* relativamente alta, en lugar del plásmido R388. De hecho, sería muy interesante poder modificar alguno de estos plásmidos para introducir nuestra construcción fluorescente y testar su diseminación *in vivo*.

5.1.2. Resultados de la diseminación de EGM *ex vivo*.

La metodología diseñada y puesta a punto en este estudio tiene el objetivo de evitar el cultivo de las bacterias en los experimentos realizados para visualizar diseminación de EGM pues se sabe que únicamente una fracción minoritaria de la microbiota intestinal es cultivable en el laboratorio (183). No obstante, no fuimos capaces de detectar bacterias TC en los experimentos de diseminación *ex vivo* utilizando la microbiota no cultivada del contenido cecal de ratones como población aceptora de los plásmidos conjugativos. Una posible explicación de este fenómeno puede ser que las bacterias necesiten sintetizar algunas proteínas previamente a adquirir los plásmidos conjugativos; por ello, y pese a saber que se perdería diversidad, decidimos testar la microbiota cultivada del contenido cecal de los ratones de forma que tuviésemos una población “activa” como aceptora de los plásmidos conjugativos. No obstante, el medio de cultivo seleccionado para crecer las bacterias intestinales fue aquel en el estudios previos de nuestro grupo (144) habían detectado que permitía el crecimiento de una mayor diversidad de bacterias. En este caso, sí que fuimos capaces de detectar bacterias TC para todas las combinaciones diferentes de plásmido y promotor testadas (Resultados, apartado 4.1.3., figura R10).

A diferencia de lo que acabamos de comentar, en el caso de los experimentos *ex vivo* realizados con la microbiota fecal humana fuimos capaces de detectar TC al utilizar como población aceptora tanto las bacterias sin cultivar como las cultivadas (Resultados, apartado 4.1.4., figuras R16 y R17), por lo que parece que no es necesario, al menos en el caso de la microbiota humana, ese proceso de activación bacteriana que habíamos hipotetizado previamente. Podría ocurrir, que las bacterias que tienen una mayor afinidad por los plásmidos conjugativos estén en niveles demasiado bajos en la microbiota intestinal del ratón como para aceptar el plásmido o como para que la transferencia sea detectada por citometría de flujo y, únicamente al cultivar el contenido cecal esas bacterias tienen la oportunidad de expandir y captar los plásmidos conjugativos. Según esta teoría, en el caso de la microbiota humana, la abundancia de estas bacterias sería desde un principio suficiente para adquirir los plásmidos.

Otra posible explicación sería la presencia en el contenido cecal de ratones, de ciertas condiciones o moléculas con capacidad de inhibir la conjugación. La transferencia de EGM es un proceso complejo que depende de diversos factores propios tanto de las bacterias que actúan como donante y aceptora de material genético como de las condiciones abióticas en las que estas bacterias se encuentran. En lo relativo a la pareja de bacterias donadora-aceptora, el sistema de replicación, y los sistemas de inmunidad como CRISPR-Cas o sistemas de restricción podrían ser determinantes en la entrada o el mantenimiento del material exógeno en el interior de la nueva bacteria (33,184). La presencia de otros plásmidos es también un aspecto clave, existen plásmidos que potencian la diseminación y estabilidad de otros (185,186), sin embargo, son bien conocidos los mecanismos de exclusión de entrada que impiden la permanencia de dos plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad dentro de la misma bacteria (187). Por otro lado, debe tenerse en cuenta el coste que supone para la célula la presencia de plásmidos (188) que puede hacer que muchos de ellos se pierdan si no existen en el ambiente una presión selectiva que confiera ventaja a las bacterias portadoras del material genético extra frente al resto de la población.

Esta presión selectiva suele venir, en muchas ocasiones, de las condiciones ambientales como la presencia de antibióticos en el medio que puede favorecer la expansión de bacterias con plásmidos que contienen genes de resistencia a antibióticos (189) o limitación en la disponibilidad de nutrientes que favorezca a aquellas bacterias con genes que habilitan nuevas rutas metabólicas alojados en plásmidos. Cabe señalar que estos factores abióticos y todos aquellos que puedan generar un estrés en la bacteria (16), tienen también un efecto indirecto en la transferencia de plásmidos conjugativos pues son capaces de cambiar la estructura poblacional (190), modulando la densidad de las poblaciones donantes yceptoras de plásmidos conjugativos. Además, existen moléculas específicas que pueden estar presentes en el medio como los bifosfonatos, un quelante que inhiben a la ADN relaxasa impidiendo el proceso de conjugación (191), o los ácidos grasos insaturados (i.e. oleico, linoleico, derivados de aceites vegetales o de pescado). Se ha demostrado que estos ácidos grasos, a pesar de no poseer actividad inhibitoria de la conjugación en plásmidos de los grupos IncN o IncP (grupo al que pertenece el plásmido RP4, utilizado

en nuestro estudio) son efectivos disminuyendo la transferencia de los plásmidos de los grupos IncI, IncL/M e IncX e inhiben por completo la conjugación de los grupos IncF, IncH e IncW (al que pertenece el plásmido R388 usado en nuestro estudio) actuando sobre la ATPasa TrWD (o su homólogo VirB11 en el plásmido R388) de hospedadores como *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, sin afectar de ningún modo al crecimiento bacteriano (192,193). La presencia de este tipo de ácidos grasos o de otros componentes derivados de la dieta en el intestino del ratón podrían explicar tanto la ausencia de TC al utilizar la microbiota no cultivada de ratón para los experimentos *ex vivo* como la variabilidad de bacterias TC encontrada entre experimentos. Estudios de metabolómica podrían ser realizados para encontrar correlaciones entre compuestos presentes en el contenido cecal, como los ácidos grasos insaturados y la variabilidad encontrada en la transferencia de plásmidos en nuestros experimentos. Sería muy interesante también el desarrollo de estos compuestos para su implementación en la lucha frente a la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos utilizándolos como inhibidores de la conjugación en los lugares en los que se han observado unas tasas más altas de transferencia de EGM como pueden ser las granjas, piscifactorías, plantas de tratamiento de aguas residuales o incluso entornos clínicos.

A la hora de la secuenciación del gen 16s rRNA, al igual que durante el proceso de separación celular, es fundamental contar con los controles negativos necesarios para poder asegurar que las bacterias aisladas y posteriormente secuenciadas, son realmente TC y no aparecen derivadas del ruido de fondo del sistema, o por posibles contaminaciones de la muestra. A este respecto cabe mencionar que, pese a la supuesta esterilidad de los reactivos utilizados, tras la secuenciación aparecen del orden de $10^4 - 10^5$ secuencias en las muestras procedentes del PBS utilizado en el proceso de separación celular y el agua del kit de extracción de ADN (Resultados, apartados 4.1.3 y 4.1.4, tablas R1B y R2B). Para evitar los falsos positivos, es decir, estar considerando conjugaciones que nunca han llegado a ocurrir, estas secuencias y sus ASVs correspondientes, fueron eliminadas del análisis a excepción de si su abundancia en las muestras de recipientes o transconjugantes era más de 5 veces superior a la abundancia máxima de esa misma ASV en los controles negativos, en

cuyo caso se consideró que había habido una contaminación desde las muestras de estudio a los controles negativos y su eliminación podría estar haciendo que perdiésemos información importante en cuanto a la diseminación de los EGM. Sin embargo, cabe señalar que este criterio utilizado de mantenimiento de ASVs que aparecían en menor proporción en los controles, únicamente afectó 3 ASVs que aparecieran en los controles negativos pero cuya abundancia con respecto al total de secuencias era inferior al 0,03 % en cada caso, por lo que consideramos que los resultados presentados en este estudio presentan un alto grado de fiabilidad.

La composición de las poblaciones bacterianas donde ha ocurrido TC fue significativamente diferente a la población aceptora tanto en los experimentos realizados con microbiota intestinal murina como con microbiota intestinal humana (Resultados, apartados 4.1.3 y 4.1.4, figuras R12 y R19). Estas diferencias nos hablan de la imposibilidad de los plásmidos de ser aceptados por la totalidad de las bacterias. En línea con nuestros resultados, el estudio de diseminación de plásmidos conjugativos a la microbiota de suelo sugería que el hecho de que la abundancia de las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, similar a ASVs) TC encontradas no se corresponda con la abundancia de esas mismas OTUs en la población aceptora, indica que la transferencia no ocurre de forma homogénea, sino que tiene preferencia por ciertos grupos bacterianos (6).

Distintos aspectos deben de ser tenidos en cuenta a la hora de intentar explicar el rango de posibles bacteriasceptoras para un plásmido conjugativo dado, algunos de los cuales, como el sistema CRISPR-Cas o los sistemas de exclusión de entrada y de superficie, que determinan el grupo de incompatibilidad de los plásmidos, han sido ya mencionados con anterioridad en esta discusión. Existen diversas hipótesis sobre el papel biológico de los sistemas de exclusión entre las que destacan (i) el evitar un exceso de eventos de conjugación que pueda llevar a un descenso del fitness de la célula hospedadora, lo que se conoce como zigosis letal, (ii) el evitar un alto grado de eventos de recombinación que podrían ser perjudiciales para el plásmido, o (iii) que estos mecanismos hayan evolucionado como respuesta a la competición entre plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad (187); probablemente, el mecanismo evolutivo responda a una combinación de todas ellas. Por otro lado, también son

importantes los sistemas de reconocimiento entre células que permite la síntesis de toda la maquinaria de secreción necesaria para que se lleve a cabo la conjugación. Por ejemplo, un única mutación en el gen *trbC* que codifica para la pilina implicada en el apareamiento de las parejas (proceso también conocido como mating-pairs), es capaz de incrementar el rango de hospedadores del plásmido pB10 (IncP) (194). Otro aspecto que puede afectar al rango de hospedadores que adquieren el plásmido conjugativos es la estabilidad del plásmido en la célula aceptora. Podría ocurrir que, tras el proceso de conjugación, el plásmido tenga una baja estabilidad en la célula aceptora, se pierda relativamente pronto, y no seamos capaces de detectarlo mediante nuestro sistema. No existen muchos estudios que hablen sobre la estabilidad de los plásmidos conjugativos de amplio espectro de hospedador en las bacteriasceptoras cuando se elimina la presión selectiva para la cual dicho plásmido pueda conferir una ventaja evolutiva. En 2007, De Gelder y colaboradores realizaron un estudio en el que examinaron la estabilidad del plásmido pB10 en 19 cepas de Alpha, Beta y Gammaproteobacterias observando una gran variabilidad en la estabilidad del plásmido incluso entre cepas de la misma especie (195). Debido a que las causas de inestabilidad pueden ser diferentes en función del tipo de bacteria aceptora del plásmido, cabe esperar que las mutaciones que en algunos hospedadores incrementen la estabilidad plasmídica puedan tener un efecto neutro o negativo para la estabilidad del plásmido en otros hospedadores (194). Recientemente se ha concluido mediante una serie de modelos matemáticos, que de todos los factores que pueden afectar a la persistencia de los plásmidos, los más importantes son en este orden: las interacciones que afectan al fitness bacteriano, las que afectan a la conjugación y las que afectan a la pérdida del plásmido (196). Además de mantenerse en la bacteria aceptora, para que podamos detectar el plásmido por citometría de flujo es fundamental que se exprese el gen que codifica para la proteína fluorescente, lo cual, ya hemos descrito anteriormente que dependerá de la posibilidad del promotor para expresarse en dicha bacteria. Toda esta información nos lleva a concluir que, en la complejidad del proceso de conjugación, el número de posibles bacteriasceptoras es siempre mayor que el número de bacterias en las cuales podrá mantenerse el plásmido a medio o largo plazo una vez se haya transferido y éste a su vez podría ser mayor que el número de

bacterias en las que se expresará la proteína fluorescente en niveles suficientes como para ser detectada por citometría.

Diferentes estudios se han publicado sobre diseminación de plásmidos en comunidades complejas como el suelo, las aguas residuales o el intestino. Discutiremos a continuación los resultados de nuestro trabajo en comparación con los dos estudios que nos parece que tienen una mayor relación con nuestro trabajo debido a la metodología empleada en uno de los casos y la población aceptora estudiada en el otro.

A pesar de la complejidad del proceso de conjugación, nuestros resultados muestran que la metodología empleada nos permite detectar diseminación de plásmidos a un gran número de bacterias diferentes de la microbiota intestinal. Estos datos están en consonancia con la diseminación encontrada por Klümper y colaboradores en su estudio de diseminación de plásmidos a la microbiota de suelo (6). En dicho estudio se testaron 3 bacterias donadoras diferentes: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Kluyvera sp.* y 3 plásmidos conjugativos de amplio espectro de diseminación: RP4 (IncP-1 α), pIPO₂ (IncPromA) y pKJK₅ (IncP-1 ϵ). El análisis global de la microbiota de las diferentes poblaciones del estudio de Klümper muestra que los TC, independientemente de la bacteria utilizada como donadora y del plásmido empleado, se diferencian de la población aceptora, al igual que ocurre con los resultados obtenidos en nuestro trabajo (Resultados, apartados 4.1.3 y 4.1.4, figuras R12 y R19). Además, tanto si se considera el mismo plásmido en distintas bacterias donadoras, como el mismo donador portando distintos plásmidos, los TC obtenidos son diferentes. Estos resultados confirman que la conjugación es un proceso dependiente tanto de la bacteria donadora, pues los TC varían incluso aunque éstas pertenezcan a la misma familia (*E. coli* y *Kluyvera sp.*), como del plásmido conjugativo empleado, pues incluso aunque sean todos de amplio espectro de diseminación o pertenezcan a grupos de incompatibilidad muy próximos (IncP-1 α y IncP-1 ϵ), los TC obtenidos son diferentes. Esta conclusión está en consonancia con trabajos que se han realizado con posterioridad en los que se concluye que la conjugación es donador y plásmido dependiente (173).

Contemplando la posibilidad de que además de la bacteria donadora y los plásmidos utilizados hubiese también en el proceso una dependencia de la bacteria aceptora, en nuestro estudio se emplearon 2 plásmidos (R388 y RP4) modificados con dos promotores diferentes (Ptet y Plac) con el objetivo de abarcar un mayor número de potenciales bacterias aceptoras; sin embargo, se utilizó siempre la misma cepa de *E. coli* como bacteria donadora. Los resultados obtenidos fueron diferentes para cada una de las combinaciones testadas (Resultados, apartados 4.1.3 y 4.1.4, figuras R14 y R21). Cabe destacar la elevada diversidad de TC detectados cuando se utilizó la construcción R388::Plac::sfGFP como donadora en los experimentos con microbiota cecal de ratón como población aceptora (Resultados, apartados 4.1.3, figura R14). Al observar el Heatmap, parece que exista una mayor diversidad en esta muestra que incluso en las poblaciones aceptoras secuenciadas; sin embargo, el índice de diversidad Shannon (Resultados, apartado 4.1.3, figura R12C) no fue más elevado, para ninguna población de TC estudiada, que el obtenido para sus respectivas poblaciones de microbiota aceptora. Esta aparente incongruencia entre el Heatmap y el índice de Shannon puede deberse a que el primero recoge los datos a nivel del género bacteriano mientras que el índice de Shannon está calculado a nivel de ASVs. Es importante puntualizar que los protocolos de separación celular, extracción de ADN, secuenciación y análisis se realizaron de manera estandarizada para todas las muestras (tanto las muestras de TC como las muestras de microbiota aceptora) por lo que no esperamos que estos procesos hayan podido añadir variabilidad al estudio.

El diseño inicial del proyecto contemplaba el aislamiento de bacterias que adquiriesen el plásmido en una primera generación de conjugación para utilizarlas como bacterias donadoras en una segunda ronda de conjugaciones tanto *ex vivo* como *in vivo* y poder estudiar así las diferencias de diseminación en función de la bacteria donadora del plásmido conjugativo; sin embargo, la limitación de tiempo no nos permitió abordar este aspecto.

Otro indicio que nos sugiere que la conjugación es también dependiente de la población aceptora lo encontramos en la réplicas de los diferentes experimentos, en los que utilizando la misma bacteria donadora y el mismo plásmido conjugativo, los aislados TC obtenidos por citometría de flujo difieren dependiendo del ratón del que

se obtiene la microbiota aceptora (Resultados, apartado 4.1.3, figura R14). Lo mismo ocurre en los experimentos que utilizan microbiota humana como aceptora de los plásmidos, la cual varía ligeramente entre experimentos (Resultados, apartado 4.1.4, figura R21).

Los estudios de Klümper evidencian transferencia de los plásmidos conjugativos a 281 OTUs diferentes de los cuales 74 eran comunes al estudiar la transferencia de los 3 plásmidos conjugativos con la misma bacteria donadora conteniendo bacterias pertenecientes a los grupos Enterobacteriales, Burkholderiales, Pseudomonadales y Rhizobiales. En nuestro caso, encontramos una gran diversidad de géneros donde se transfieren los plásmidos. A pesar de que hemos secuenciado también controles negativos y descartado todas aquellas ASVs que aparecían en dichos controles, hemos de ser cautos y no descartar completamente la posibilidad de que alguno de los géneros identificados de manera muy poco frecuente, sea quizá debido a contaminación ambiental. Sin embargo, entre las bacterias en las que se han identificado eventos de TC de manera más frecuente, encontramos géneros que habitualmente forman parte del microbioma intestinal. Por ejemplo, los géneros TC detectados como mejores aceptores de los plásmidos conjugativos fueron *Pseudomonas* y *Bacteroides* en el caso de utilizar microbiota cecal murina como población aceptora (Resultados, apartado 4.1.3, figura R15) y el grupo de las enterobacterias, con especial representación del género *Escherichia/Shigella* en el caso del uso de microbiota intestinal humana para los experimentos (Resultados, apartado 4.1.4, figura R22). La relevancia de los géneros detectados la discutiremos un poco más adelante.

Estudios evolutivos mediante el análisis comparativo de secuencias plasmídicas sugieren que el rango de hospedadores para los plásmidos de la familia IncP (i.e. RP4) parece estar mayoritariamente limitado a las Proteobacterias (197), sin embargo, el grupo de Klümper detectó diseminación del plásmido a una gran variedad de bacterias Gram positivas: más de 15 OTUs diferentes del filo Actinobacteria y más de 10 OTUs pertenecientes a órdenes de Bacilli y Clostridium dentro del filo Firmicutes. También en nuestro caso se detectó transferencia del plásmido RP4 a géneros de los filos Bacteroidetes y Firmicutes en el caso de la microbiota humana (Resultados, apartado

4.1.4, figura R22) y Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Fusobacteria en el caso de la microbiota cecal de ratón (Resultados, apartado 4.1.3, figura R15). Cabe destacar que el hecho de que hayamos detectado transferencia en este tipo de bacterias alejadas filogenéticamente no implica que el plásmido sea capaz de persistir. De hecho, una vez expresada la fluorescencia, podría mantenerse durante un tiempo incluso aunque el plásmido no se replicara. Sería interesante poder comprobar de forma experimental la estabilidad de los plásmidos en las bacterias TC, aunque para ello deba de recurrirse al cultivo bacteriano, pues tanto en el estudio de Klümper como en nuestro trabajo, la detección del plásmido en ciertas bacterias puede deberse a una expresión temporal de la proteína en la bacteria pero que el plásmido se pierda en las sucesivas generaciones. En nuestro grupo hemos desarrollado recientemente una nueva construcción en la que tanto el gen de resistencia a cloranfenicol como el que expresa la proteína fluorescente se encuentran bajo el control del mismo promotor de forma que, las bacterias donadoras son sensibles al antibiótico, pues contienen el represor del promotor en su cromosoma pero las TC son resistentes, de forma que además de la diferenciación por fluorescencia podemos diferenciarlas mediante cultivo en medios con el antibiótico. Así pues, podremos ser capaces de hacer estudios sobre la persistencia y estabilidad de los plásmidos en aquellas bacterias TC que seamos capaces de cultivar en el laboratorio. También podremos saber si estas bacterias TC, independientemente del tiempo que el plásmido se mantenga en su interior, son a su vez capaces de transferirlo a otras bacterias. Este hecho podría incrementar el rango de posibles bacterias aceptoras permitiendo la diseminación a un primer grupo bacteriano y, partir de este, a otros grupos que inicialmente no estaban accesibles (198).

Una limitación tanto de nuestro trabajo como del de Klümper es que no somos capaces de diferenciar la TGH original de las transferencias verticales sucesivas debidas a la división bacteriana, por lo que la abundancia relativa de las bacterias detectadas como TC estará influida no sólo por la eficiencia en la captación de los plásmidos conjugativos, sino por la tasa de multiplicación celular. En cualquier caso, los datos expuestos en las figuras R14 y R21 (Resultados, apartados 4.1.3. y 4.1.4) muestran la presencia/ausencia del plásmido en un género dado, sin tener en cuenta la abundancia

del mismo. Más aun, el análisis de coordenadas principales (Resultados, Figuras R12 y R19) está realizado con la distancia unweighted unifrac que no tiene en cuenta la abundancia de las bacterias sino la presencia y ausencia. Cabe destacar que, en ambos estudios, muchos de los organismos identificados como TC pertenecen a grupos que contienen patógenos oportunistas humanos que en muchas ocasiones contienen cepas multirresistentes como son las enterobacterias y *Pseudomonas* dentro del grupo de las Proteobacterias, pero también bacterias de otros taxones como *Streptococcus*, *Staphylococcus* o *Enterococcus*. Estos resultados arrojan luz sobre los posibles mecanismos de generación de cepas multirresistentes evidenciando el papel crucial de la conjugación en este proceso. No debemos olvidar que estos grupos bacterianos pueden tener la oportunidad de expandir hasta niveles elevados en el intestino, por lo que la acumulación en su interior de genes de resistencia a antibióticos podría dar lugar a futuras infecciones por patógenos multirresistentes que serían muy difíciles de tratar. Otras de las bacterias que más frecuentemente hemos detectado como TC en nuestros experimentos son aquellas del género *Bacteroides*, un grupo bacteriano muy representado entre las bacterias comensales de la microbiota intestinal humana. Estos resultados subrayan la importancia que puede tener la microbiota comensal como reservorio de genes de resistencia a antibióticos, pudiendo actuar como futuros donantes de EGM a patógenos que lleguen al intestino (73,74). En cualquier caso, futuros experimentos deberían ser realizados con el fin de testar si *Bacteroides* es capaz de mantener el plásmido y posteriormente transmitirlo a otras cepas.

Recientemente, se ha publicado un estudio que, al igual que el nuestro, analiza la diseminación de un plásmido conjugativo con resistencia a antibióticos en la microbiota intestinal tanto *in vitro* como *in vivo* (175). En este caso, el modelo de estudio que se utiliza es el intestino del pez cebra. Por un lado, Loftie-Eaton y colaboradores demuestran la capacidad del plásmido pB10 (IncP) de transferirse *in vitro* a algunas de las bacterias más abundantes de la microbiota intestinal del pez cebra como son *Aeromonas veronii* y *Plesiomonas shigelloides*. Además estudiaron la capacidad de estas bacterias de comportarse como nuevos donadores mostrando que la primera es capaz de transferir el plásmido incluso a nuevas bacterias en las que no se había podido detectar transferencia al utilizar *E. coli* como bacteria donadora,

mientras que *P. shigelloides* no fue capaz de transferir el plásmido a ninguna de las bacterias testadas. De nuevo nos encontramos ante la evidencia de que el fenómeno de conjugación depende, entre otros factores, de la combinación de bacterias donante-aceptora. Por otro lado, también estudiaron la transferencia del plásmido *ex vivo* mezclando la bacteria donadora con la microbiota extraída del intestino del pez detectando transferencia del plásmido mediante cultivo en placa a *A. veronii*. Sin embargo, en los experimentos *in vivo* en los que alimentaban a los peces tratados con tetraciclina, un antibiótico comúnmente empleado en las piscifactorías y para el cual el plásmido confiere resistencia, únicamente se detectó transferencia del plásmido a *Achromobacter sp*, una bacteria con abundancia muy baja en el intestino de estos animales. Sin embargo, no se detectaron TC pertenecientes al género *Aeromonas*, el cual tiene un 40% de representación en la microbiota intestinal de los peces tratados con tetraciclina y el cual se había visto que conjugaba bien *in vitro*. Estos resultados están en consonancia con los resultados de Neil y colaboradores en los que se concluía que no se puede inferir el resultado de la conjugación *in vivo* en función del comportamiento del plásmido *in vitro*, sino que otros factores como la distribución espacial de las bacterias deben ser tenidos en cuenta. Posteriormente, se determinó la capacidad de esta bacteria para mantener el plásmido y para actuar como donadora del mismo a otras bacterias, confirmando lo que los datos de transferencia a bacterias poco abundantes tanto de nuestro estudio como del de Klümper sugerían que no deben de menospreciarse estas especies menos abundantes de la microbiota intestinal pues pueden actuar como potenciales reservorios de plásmidos que codifican para genes de resistencia a antibióticos (77). Los resultados obtenidos por Loftie-Eaton, son de gran relevancia puesto que su bacteria donadora no es capaz de colonizar el intestino de los peces lo que demuestra que puede existir transferencia de plásmidos presentes en la alimentación únicamente debido a su tránsito intestinal. A pesar de lo que pudiera esperarse, Loftie-Eaton detectaron transferencia *in vivo* a una única bacteria de la microbiota, sin embargo, estudios con bacterias donadoras capaces de colonizar el intestino del pez probablemente incrementarían el número y la diversidad de TC detectados, pues sabemos que los plásmidos IncP tienen mayor facilidad de diseminación cuando se encuentran en superficie (199). Por otro lado, su sistema

dependiente de cultivo bacteriano podría estar impidiendo la detección de potenciales bacterias aceptoras.

Un dato que llama mucho la atención en nuestros resultados es la alta variabilidad que existe entre los TC de cada muestra incluso cuando estos contienen el mismo plásmido y promotor. Existen diferentes hipótesis que podrían explicar este resultado, algunas de las cuales ya las hemos ido mencionando con anterioridad. La primera de ellas es que los TC observados dependan de la microbiota aceptora, la cual varía su composición cuando es cultivada durante 6 días y puede también variar ligeramente dependiendo del ratón sacrificado o del día de recogida de la muestra humana para cada uno de los experimentos. En segundo lugar, podríamos considerar que las bacterias TC comunes para la mayoría de las combinaciones testadas serían aquellas en las que el plásmido es más estable de forma que independientemente del tiempo transcurrido desde el evento de conjugación, seremos capaces de detectar la emisión de fluorescencia. En el resto de TC observados, el plásmido sería menos estable y el tiempo transcurrido desde la conjugación sería crucial para la detección de la bacteria puesto que se trataría de una emisión de fluorescencia transitoria. Por último, como el número de secuencias obtenido es limitado, puede que si en la muestra de partida existe un elevado número de aquellas bacterias que son muy eficientes a la hora de captar el plásmido, estas enmascaren a las que son menos eficientes, o que simplemente la detección de los TC poco eficientes responda a una mera cuestión de azar.

5.1.3. Resultados de la diseminación de EGM *in vivo*.

Con el objetivo de estudiar también diseminación de EGM *in vivo* se seleccionó la construcción RP4::Ptet::sfGFP para ser testada en diferentes modelos de ratón, ya que en los experimentos *ex vivo* tanto con microbiota intestinal murina como humana, se obtuvo una mayor eficiencia de conjugación con este plásmido que con el R388 (Resultados, apartado 4.1.3. y 4.1.4., figuras R10, R16 y R17). Nuestro objetivo era poder estudiar una microbiota intacta o en su defecto lo menos alterada posible, de forma que el plásmido tuviera disponible toda la población intestinal como potenciales

bacterias aceptoras y no sesgar los resultados; sin embargo, comprobamos que la microbiota natural del ratón ofrece resistencia a la colonización por *E. coli* (Resultados, apartado 4.1.5.) por lo que debíamos encontrar el equilibrio adecuado entre alteración de la microbiota y colonización.

Basándonos en un modelo de ratón en el que se demostraba colonización de *E. faecalis* en la microbiota intacta de ratones tras su administración prolongada en el agua de bebida (94), diseñamos un modelo similar en el que se administró nuestra bacteria donadora *E.coli* en el agua de bebida de los ratones a una concentración de 10^8 UFCs/ml. Los resultados de este modelo muestran elevados niveles de la bacteria administrada en las heces del ratón; sin embargo, no fuimos capaces de detectar bacterias fluorescentes por citometría (Resultados, apartado 4.1.5., figura R23A). La ausencia de conjugación a pesar de los niveles elevados de bacteria donadora en el intestino y de disponer de una microbiota intacta como población aceptora pueden deberse a que *E. coli* no llegue a colonizar el tracto intestinal sino que simplemente estemos detectando su tránsito a través del intestino y que no disponga de una superficie sólida para poder llevar a cabo la conjugación o no disponga de la proximidad necesaria para establecer relaciones estables con bacterias aceptoras del plásmido. Para poder saber con seguridad si la bacteria está colonizando el intestino deberíamos detectar los niveles de *E. coli* varios días después de que la bacteria no fuese administrada en el agua de bebida, pero debido a que el modelo no responde al objetivo del trabajo de detectar diseminación de EGM *in vivo*, no se invirtió más tiempo en su estudio.

Con el fin de asegurar la colonización intestinal de la bacteria donadora se pasó a utilizar un modelo en el que los ratones fueron tratados con 5 g/l de estreptomicina en el agua de bebida. La estreptomicina facilita la colonización de *E. coli* exógena ya que elimina las posibles enterobacterias endógenas que podrían conferir resistencia a la colonización (137). De hecho se sabe por un estudio previo realizado por nuestro grupo que la administración de estreptomicina 5 g/l en el agua de bebida permitía la colonización de *E. coli* exógena resistente a este antibiótico. Sin embargo, el tratamiento con estreptomicina elimina el 80% de las OTUs iniciales lo cual disminuye

nuestra capacidad de detectar TC, al disminuir el número posible de bacterias aceptoras.

En nuestro modelo, tras tres días de tratamiento con estreptomycin, se inocularon a los ratones 10^6 UFCs de la bacteria donadora modificada para ser resistente al antibiótico. Sin embargo, como nuestro objetivo es estudiar una microbiota lo más compleja posible para no limitar o sesgar la transferencia del plásmido, una vez que la bacteria donadora se había establecido en el intestino del ratón (cuatro días después), se detuvo el tratamiento antibiótico y se dejó a la microbiota recuperarse durante 2 semanas. Estudios previos han demostrado que a pesar de los cambios permanentes que se inducen en la microbiota intestinal debido los tratamientos antibióticos, también existe recuperación de ciertos grupos bacterianos. Además, el patógeno es capaz de persistir en el tiempo en ausencia del antibiótico (200). Paralelamente, se realizó un trasplante fecal (TF) con microbiota fecal murina a algunos de estos ratones para potenciar la recuperación de su microbiota y de esta manera aumentar las posibilidades de detectar TC en una microbiota más diversa. Cabe destacar que observamos una disminución en los niveles de *E. coli* detectados en las heces de los ratones tras detener el tratamiento con estreptomycin (Resultados, apartado 4.1.5., figura R23B). Esta disminución de *E. coli* probablemente sea debida a la recuperación parcial de la microbiota que lleva a la expansión de especies que pueden competir con la bacteria donadora, tal y como ha demostrado nuestro grupo en estudios previos con el enterococo vancomycin resistente (VRE) (101). Dicha hipótesis debería ser testada mediante la secuenciación de la microbiota pre y post tratamiento para conocer en detalle los grupos bacterianos que se recuperan tras las dos semanas de suspensión del fármaco en presencia o ausencia de TF. En cualquier caso, tanto durante el tiempo que se administró el antibiótico como durante el tiempo de recuperación tras el cese del antibiótico, no detectamos ninguna célula fluorescente, lo que sugería que o no había existido transferencia del plásmido o la transferencia había ocurrido en una población cuya abundancia se encontraba por debajo del límite de detección por citometría de flujo. Sospechando la posibilidad de que la tasa de conjugación del plásmido en el intestino no fuera lo suficientemente elevada como para poder detectar las bacterias TC por

citometría de flujo (tal y como ocurrió), decidimos finalizar el experimento administrando a los ratones una combinación de antibióticos (kanamicina y ampicilina) para los que el plásmido conjugativo confiere resistencia con el fin de potenciar la expansión de aquellas poblaciones que contengan el plásmido y así favorecer su visualización por citometría. Los resultados del segundo tratamiento antibiótico no evidenciaron expansión de la bacteria donadora mediante cultivo de las heces, quizás porque se promueva también la expansión de bacterias comensales que compiten con *E. coli*, ni permitió la detección de bacterias fluorescentes por citometría de flujo (Resultados, apartado 4.1.5., figura R24). Cabe destacar que el intento de expansión de la población que habría captado el plásmido se realizó dos semanas tras parar el tratamiento antibiótico. Como hemos indicado, la disminución de los niveles de colonización de *E.coli* tras el cese del tratamiento antibiótico podría ser una de las causas por la que no observamos TGH del plásmido mediante citometría de flujo, pues sabemos que la densidad bacteriana afecta en la eficiencia de conjugación (201). Por este motivo, en el modelo final utilizado y que dio resultados positivos respecto a la detección de TGH en el intestino, una de las modificaciones implantadas fue administrar el antibiótico que promovería la expansión de bacterias donde había ocurrido TGH, a los pocos días de haber parado el tratamiento con estreptomycin.

El modelo con el que finalmente pudimos observar diseminación del plásmido RP4 constaba de algunas modificaciones con respecto al modelo anterior: (i) teniendo en cuenta los resultados de los experimentos *ex vivo* en los que no se observaba TGH al utilizar microbiota intestinal murina no cultivada, el trasplante fecal se realizó con microbiota humana fresca, (ii) la expansión de las bacterias que contienen el plásmido conjugativo se realizó inmediatamente tras el TF, en lugar de dejar 2 semanas de recuperación de la microbiota, (iii) se utilizó como control la misma cepa de *E. coli* sin el plásmido conjugativo y se fueron sacrificando ratones secuencialmente para analizar los niveles de TC también en ciego y colon. Debido al plazo máximo de entrega de la tesis doctoral no se dispone de los resultados de la secuenciación de las bacterias TC detectadas y aisladas por lo que desconocemos qué bacterias han sido capaces de adquirir el plásmido conjugativo; sin embargo, podemos sacar algunas pequeñas conclusiones con los resultados observados por citometría de flujo (Resultados,

apartado 4.1.5., figura R25). El hecho de detectar TC tras la administración de los antibióticos que permiten la expansión de bacterias portadoras del plásmido conjugativo, pero no antes, sugiere que este plásmido se está transfiriendo a una pequeña fracción de la microbiota intestinal. Por otro lado, el hecho de detectar un mayor número de bacterias tras el segundo día de la administración del antibiótico sugiere que las bacterias que adquirieron el plásmido son capaces de expandir una vez han adquirido el plásmido. En cualquier caso consideramos que el experimento debería ser repetido para demostrar reproducibilidad del mismo. Además, con el fin de demostrar que el plásmido es capaz de persistir y transmitirse de manera vertical, deberíamos una vez identificadas las bacterias que han captado el plásmido, ser capaces de cultivarlas en medios de cultivo.

Pensamos que las últimas modificaciones introducidas en el modelo pueden ser claves a la hora de explicar el comportamiento del plásmido conjugativo *in vivo*. Podría estar ocurriendo que el TF con microbiota humana permita la introducción de bacterias con mayor capacidad para la adquisición del plásmido, corroborando lo que ya hemos comentado en varias ocasiones, que la eficiencia de conjugación es dependiente de la pareja bacteriana donante-aceptor. Por otro lado, el acortamiento del tiempo transcurrido entre el TF y la recogida de muestras para citometría podría permitirnos detectar ciertas bacterias en las que el plásmido no es muy estable y se acaba perdiendo con el tiempo.

El hecho de ir sacrificando ratones en diferentes momentos del proceso resultó en que de los 16 ratones con los que se inicia el experimento, únicamente llegamos con 4 al momento de la expansión. 2 de estos ratones estaban colonizados con la bacteria control (*E. coli* sin el plásmido conjugativo) por lo que quedaron 2 ratones para el estudio de diseminación detectándose TC en uno de ellos. La repetición de este experimento con un mayor número de ratones nos aportará también mucha información sobre la reproducibilidad que tienen los resultados obtenidos.

Estamos a la espera de los resultados de la secuenciación de las bacterias TC halladas en este ratón para poder sacar conclusiones más claras de nuestro estudio y contrastar los resultados con los obtenidos en los experimentos *ex vivo*. Es posible que,

al igual que han detectado otros grupos de investigación (174), los resultados difieren en gran medida entre los dos tipos de experimentos (*ex vivo* e *in vivo*), pues no debemos olvidar el número de factores que pueden estar involucrados en la eficiencia de conjugación *in vivo* y que no están presentes cuando se realiza la transferencia en el laboratorio. Entre ellos destacaremos:

- i) La estructura poblacional de la microbiota intestinal. Sabemos que la distribución de los grupos bacterianos difiere en las distintas partes del intestino y entre la zona más próxima al epitelio o al lumen intestinal (202), lo que podría alejar físicamente a bacterias que en los experimentos *ex vivo* hemos observado que se comportan como buenas aceptoras del plásmido. Es lo que ocurre también en comunidades complejas que forman biofilms (203).
- ii) Requerimiento de una superficie sólida para la conjugación (199). Los experimentos *ex vivo* se realizan en membranas situadas sobre medio de cultivo sólido. En el intestino, esta superficie podría ser el mucus que recubre el epitelio, pero no todas las bacterias intestinales tienen acceso a ese mucus. Por tanto, las bacterias con un crecimiento planctónico podrían no ser buenas aceptoras en este caso del plásmido conjugativo.
- iii) La densidad bacteriana y la tasa de crecimiento, que son parámetros que probablemente sean superiores *ex vivo* pero que no podemos controlar *in vivo*, afectan a la diseminación de los plásmidos conjugativos (201). En relación con este hecho, perturbaciones de la microbiota, como las derivadas de la ingesta de antibióticos o tras un proceso de inflamación, que puedan potenciar la expansión de ciertos grupos bacterianos pueden incrementar las tasas de transferencia de plásmidos conjugativos *in vivo* (204).
- iv) La disponibilidad de nutrientes y los factores de estrés ambiental que puedan estar presentes en el intestino del ratón y desaparecen en los cultivos *ex vivo*, también afectan a la eficiencia de conjugación (201).

Quizás el uso de simuladores gastrointestinales, unos modelos multi-compartimentados que reproducen de forma continua las diferentes condiciones del tracto gastrointestinal humano (estómago, intestino delgado y regiones ascendente, transversa y descendente del intestino grueso), podría permitirnos tomar muestras de diferentes partes del intestino sin necesidad de sacrificar al animal o simplificar la influencia de algunas variables del modelo, como por ejemplo la respuesta inmune del hospedador (i.e. inflamación (204)), que puedan estar involucradas en la TGH de los plásmidos conjugativos. Sin embargo, teniendo en cuenta los objetivos iniciales de este proyecto, cabe señalar que la metodología que hemos puesto a punto parece válida para la detección de TGH *in vivo*. A pesar de tan solo haber detectado conjugación en uno de los dos ratones que fueron analizados al final del experimento, teniendo en cuenta la ausencia de bacterias fluorescentes en los controles y la expansión de la población fluorescente tras el tratamiento con antibióticos para los que el plásmido conjugativo confiere resistencia, sugerimos que las bacterias detectadas son verdaderos TC. Los estudios de las secuencias del gen 16S rRNA confirmarán nuestros resultados y nos permitirán seleccionar bacterias comensales aceptoras del plásmido donde podamos estudiar su papel como reservorio de plásmidos conjugativos en la microbiota intestinal.

5.2. Estudio de la evolución a corto plazo de enterobacterias multirresistentes.

Los mecanismos típicos de resistencia a antibióticos han sido habitualmente agrupados en tres grandes categorías: modificación de las dianas, inactivación del fármaco y transporte del fármaco. En la mayoría de las ocasiones, ese mecanismo de resistencia viene condicionado por la adquisición de información genética exógena mediante TGH. La conjugación bacteriana está considerada como una de las principales vías de generación de cepas multirresistentes debido a la transferencia de plásmidos que contienen genes resistentes a antibióticos (166).

Uno de los objetivos de nuestro trabajo es el estudio de la evolución a corto plazo de enterobacterias multirresistentes *in vivo*. Para este propósito, nuestro modelo consiste en aislados bacterianos procedentes de muestras rectales de pacientes con leucemia aguda ingresados en el Hospital La Fe de Valencia. Las características de estos pacientes, con un sistema inmunitario debilitado y una microbiota intestinal alterada por los tratamientos antibióticos recibidos, les hacen muy susceptibles a ser colonizados por enterobacterias multirresistentes (EMR) (9).

En el presente estudio se seleccionaron aislados procedentes de un mismo paciente y una misma especie bacteriana en la que se detectara una adquisición de resistencia a algún nuevo antibiótico en un plazo máximo de 15 días. Cabe señalar que el patrón de resistencia de cada bacteria fue obtenido mediante Vitek, un sistema colorimétrico capaz de aportar datos sobre la susceptibilidad de las bacterias a los distintos antibióticos clasificándola como Sensible, Resistente o Intermedio para cada uno de los 17 antibióticos testados. Es importante señalar que Vitek hace una lectura interpretada para ayudar a la toma de decisiones rápida en cuanto al tratamiento de elección para el paciente. Esto significa que, en ocasiones, puede que no detecte resistencia para un antibiótico, pero lo marcará como resistente si al comparar el patrón fenotípico con las bases de datos detecta que el antibiótico en cuestión no será una buena elección para el tratamiento (i.e., interacciones entre antibióticos). Esto podría complicar la interpretación de los resultados, pues podríamos estar buscando mecanismos de resistencia para antibióticos para los que la bacteria pudiera no ser realmente resistente. Sin embargo, todos los resultados que Vitek marcaba como

ambiguos, extraños, o indeterminados fueron posteriormente confirmados mediante la técnica de disco-difusión por el personal del servicio de microbiología clínica del hospital. También es importante indicar que no disponemos de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) en cada caso, sino exclusivamente de la información sobre sensibilidad o resistencia. Para los aislados seleccionados, se secuenció y analizó el genoma completo en búsqueda de genes o mecanismos que pudiesen explicar la resistencia adquirida.

En primer lugar, intentamos demostrar que estos aislados no responden a una situación de co-colonización del paciente por dos cepas diferentes de la misma especie bacteriana con diferencias en el patrón de resistencia, algo que ocurre con relativa frecuencia (31,7%) en estos pacientes según estudios previos (205), sino que se trata de una misma cepa que ha adquirido una resistencia nueva a algún antibiótico. Para ello se determinó tanto el ST de las cepas como el número de SNPs entre los aislados de la pareja. Todas aquellas parejas de aislados cuyos miembros no tuvieran el mismo ST o el número de SNPs entre ellas fuese mayor que el número de SNPs con otros aislados de esa misma especie fueron descartados del análisis.

Entre los pares de aislados considerados como la misma cepa, todos los pertenecientes a la especie *E. hormaechei* (3 pares de aislados) pertenecen al mismo ST, al igual que ocurre con los aislados de *K. oxytoca* (2 pares de aislados). En el caso de *K. pneumoniae*, 3 de los 7 pares de muestras tenían el mismo ST; sin embargo, cada pareja de aislados de *E. coli* era de un ST diferente (Resultados, apartado 4.2.3.1., tabla R4). El hecho de encontrar STs repetidos podría indicar que éstos son dominantes en las infecciones hospitalarias y que se transfieren de forma muy eficiente entre los pacientes hospitalizados; mientras que una diversidad de STs dentro de la misma especie bacteriana sugiere que o bien existe una gran diversidad de cepas resistentes que están circulando por el hospital o bien se trata de cepas multirresistentes que se generan *de novo* en los pacientes, es decir, enterobacterias comensales de los pacientes que adquieren material genético que codifica resistencia para varios antibióticos convirtiéndolas rápidamente en multirresistentes. Nuestros datos reproducen en parte lo publicado recientemente por León-Sampedro y colaboradores al analizar una colección de 103 aislados clínicos de *K. pneumoniae* y 45 aislados

clínicos de *E. coli* resistentes a carbapenemasas. Ellos observaban que los aislados de *K. pneumoniae* se agrupaban fundamentalmente en tres STs diferentes, mientras que en el caso de los aislados de *E. coli* existía una población mucho más diversa (206). Estos datos sugieren que un pequeño número de *K. pneumoniae* son responsables de la mayoría de las transferencias de bacterias entre pacientes mientras que esta transmisión entre pacientes ocurre de forma más esporádica para *E. coli*.

Sorprendentemente, el número de SNPs entre los pares de aislados era considerablemente superior al que se esperaría por evolución de cepas en un tiempo máximo de dos semanas. Una posible explicación para el elevado número de SNPs podríamos encontrarla en caso de que los quimioterápicos administrados pudieran reactivarse en el intestino, como ocurre con el irinotecan utilizado para tratamiento de cáncer colorrectal (207) e inducir mutaciones en las bacterias de la microbiota. Quizás, mutaciones en los genes relacionados con los sistemas de corrección de errores podrían llevar posteriormente a la presencia de un elevado número de mutaciones aleatorias en el genoma.

Para intentar comprobar esta hipótesis se estudió la localización genómica de los SNPs en cada par de muestras. Los resultados encontrados no mostraron mutaciones en genes relacionados con los sistemas de corrección de errores; además, estas mutaciones se encontraron generalmente repartidas de forma aleatoria en el genoma. Exclusivamente encontramos acumulación de mutaciones (> 3 SNPs en un mismo gen) en las parejas 7, 8 y 15 en las que los genes mutados codifican, respectivamente, para oxalacetato descarboxilasa (4 SNPs), el represor del regulón glicerol-3-fosfato (6 SNPs) y serina-D deshidratasa (8 SNPs). Estos genes no parecen tener relación directa con la resistencia a antibióticos y, más bien, parecen estar relacionados con el metabolismo de la bacteria. Cabe destacar que un estudio recientemente publicado mostró la importancia de mutaciones en genes relacionados con el metabolismo bacteriano en la resistencia frente a antibióticos (18). En dicho trabajo, Lopatkin y colaboradores detectaron mediante estudios de evolución *in vitro* una serie de genes implicados en el metabolismo celular (generación de precursores metabólicos, síntesis del glutamato, respiración y cadena de transporte de electrones) que son responsables de la adquisición de resistencia a uno o incluso varios

antibióticos al mismo tiempo. Para confirmar sus resultados, expresaron una selección de los genes detectados en su forma original y mutante, encontrando un aumento de la MIC para al menos un antibiótico en las bacterias que expresan la forma mutante del gen. Además, demostraron la presencia de este tipo de mutaciones en muestras clínicas en niveles similares o incluso superiores a las mutaciones que clásicamente se han relacionado con la generación de resistencias (18). Estos resultados sugieren un nuevo tipo de mecanismo involucrado en la adquisición de resistencias a antibióticos que no debe ser menospreciado. La expresión de las variantes génicas encontradas en nuestro trabajo que presentaban acumulación de mutaciones frente a los genes originales sería un estudio muy interesante para determinar si estos genes podrían dar respuesta al fenotipo de resistencia adquirido, especialmente teniendo en cuenta que para la pareja 15 no hemos encontrado ninguna otra posible explicación del mecanismo de resistencia adquirido.

Dejando a un lado esta información relativa a la importancia de las mutaciones en genes implicados en el metabolismo celular, nuestro estudio se centró en la identificación de genes propiamente relacionados con la resistencia a antibióticos que pudieran haber sido adquiridos mediante algún mecanismo de TGH y/o mutaciones en este tipo de genes. Los resultados obtenidos detectan parejas con uno u otro mecanismo e incluso algunas de ellas con ambos simultáneamente.

En primer lugar, debemos destacar la detección de adquisición de algún tipo de EGM (transposón o plásmido) en las parejas 1, 2, 4, 10, 13, 16 y 17. Es verdad que la selección de las muestras propicia la detección de este tipo de material genético, pues sabemos que los EGM codifican para numerosos genes de resistencia a antibióticos; sin embargo, únicamente en las parejas 1, 13 y 17, esta adquisición está relacionada con las nuevas resistencias observadas fenotípicamente (Resultados, apartado 4.2.4).

El hecho de detectar otro tipo de TGH no relacionada con la resistencia observada sugiere que la transferencia de EGM *in vivo* en los pacientes con leucemia aguda hospitalizados ocurre con elevada frecuencia. Diversos estudios publicados relacionan la activación de la respuesta SOS celular ante situación de estrés con un aumento de la frecuencia de TGH. En concreto, Beaver y colaboradores demuestran

que la ciprofloxacina es capaz de inducir el mecanismo de respuesta SOS que aumenta la expresión de los genes necesarios para la transferencia de material genético entre las células (16). Teniendo en cuenta la administración profiláctica de ciprofloxacina a los pacientes con leucemia que ingresan en el hospital y la duración del tratamiento durante todo el tiempo de hospitalización, no es de extrañar la elevada frecuencia de adquisición de EGM que se detecta en las EMR aisladas en las muestras fecales de estos pacientes. Sin embargo, la ciprofloxacina no es el único antibiótico que ha sido relacionado con un aumento en la frecuencia de la tasa de TGH, sino que este efecto también se ha descrito tras el uso de cefotaxima, que induce la conjugación del plásmido IncI-1, conteniendo el gen de resistencia $bla_{CTX-M-1}$ en *E. coli*, por un aumento en la expresión de los genes *tra* relacionados con la conjugación (208). De igual modo, se ha descrito que la gentamicina puede inducir la conjugación entre cepas de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* mediante el bloqueo del *quorum sensing* (209).

Además de los antibióticos, se ha demostrado que otras sustancias, como los desinfectantes, entre ellos la cloramina y el peróxido de hidrógeno, que podrían usarse en los ambientes hospitalarios, promueven la transferencia de los genes de resistencia *sull* y *aadA2* desde *Aerococcus sp.* a *Pseudoalteromonas spp.* (210). Se ha demostrado que otros fármacos no antibióticos, como la carbazepina, utilizado para las crisis epilépticas, o el triclosán, potencian la TGH por diferentes mecanismos (211-213). A este respecto, deberían establecerse estudios para demostrar posibles asociaciones entre la administración de fármacos quimioterápicos y antibióticos (de profilaxis o para el tratamiento de infecciones) a los pacientes y la aparición de nuevas cepas multirresistentes en la microbiota intestinal.

En segundo lugar, señalamos la detección de mutaciones en genes relacionados con la resistencia a antibióticos en 6 de las parejas estudiadas (parejas 4, 5, 6, 7, 8 y 11). Para 5 de estas parejas, las mutaciones se localizaban en genes relacionados con sistemas de transporte o porinas. Estudios similares al nuestro, como el de Aihara y colaboradores en 2020, confirman la importancia de las mutaciones en las porinas en la ampliación del fenotipo resistente (214). En su estudio, 2 *K. pneumoniae* pertenecientes al ST45 fueron aisladas de la sangre de un mismo paciente hospitalizado con 33 días de diferencia entre ellas. El segundo aislado tenía un

fenotipo resistente más amplio que el primero, incluyendo en estos nuevos antibióticos los carbapenémicos. A pesar de no detectar ninguna adquisición de material genético, los investigadores reportaron 3 mutaciones génicas, 2 de ellas relacionadas con la expresión de proteínas de la membrana externa que están involucradas en la adquisición de resistencias a múltiples antibióticos por pérdida de la permeabilidad celular (214).

Para nuestra sorpresa, de las 5 mutaciones presentes en genes relacionados con el transporte a través de membrana, encontramos en 3 ocasiones afectada la proteína BamA. En los tres casos, el antibiótico al que se intenta dar una explicación por adquisición de resistencias es un betalactámico (en dos ocasiones cefoxitina y en otra ocasión meropenem); sin embargo, cada una de las mutaciones fue encontrada en una especie bacteriana diferente: *E. hormaechei*, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* (Resultados, apartado 4.2.4.). La proteína BamA es un componente esencial del complejo BAM. Esta proteína de superficie tiene una doble función: por un lado, facilita el plegamiento de las proteínas en forma de barriles β para su inserción en la membrana externa y, por otro, regula la entrada de ciertos compuestos, como los antibióticos, al interior celular (17). Esta proteína es una de las principales dianas en estudio para el diseño de nuevos fármacos antimicrobianos e incluso posibles epítomos para vacunas, ya que es una proteína esencial, localizada en la superficie de los patógenos, sin homología con proteínas humanas, de ratón ni con bacterias probióticas que residen en el intestino humano, presenta cualidades físico-químicas favorables y tienen una amplia red de interacciones en el interior celular (215). De hecho, se han descrito diferentes compuestos que inhiben la proteína BamA como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales frente a BamA, que se unen a la proteína impidiendo que ejerza su función llevando a la muerte celular (17), o el compuesto MRL-494, que, además de inhibir a BamA, tiene la capacidad de disgregar la membrana citoplasmática de las bacterias que carecen de pared celular (216). Sería deseable la realización en el futuro de estudios más detallados de las mutaciones detectadas en nuestro trabajo en los genes que codifican para la proteína BamA y para el resto de las proteínas de transporte que pudieran ampliar nuestros conocimientos sobre la relación entre las porinas y la susceptibilidad a los antibióticos.

En tercer lugar, no podemos olvidar que existen una serie de parejas (parejas 3, 9, 12, 14 y 15) para las cuales, con los datos que disponemos, no se ha podido sugerir ningún posible mecanismo que explique la adquisición de resistencia. Para estos casos, en primer lugar, deberíamos de obtener información más concreta sobre la resistencia al fármaco (i.e. MIC) para confirmar que realmente existe ese cambio de susceptibilidad al antibiótico o si simplemente se trata de una resistencia como consecuencia de las interacciones entre los fármacos administrados, como hemos mencionado anteriormente o, como también veíamos al hablar sobre la citometría de flujo, de variaciones en la expresión génica de las poblaciones celulares que, al acontecer próximas a los umbrales de MIC, puedan generar confusión en los resultados. De todos modos, el hecho de no poder explicar la resistencia puede sugerir que existen otros mecanismos implicados que se escapan de los sistemas tradicionales de detección de resistencias a antibióticos. Entre ellos, los genes implicados en el metabolismo (18) y otros mecanismos que no hayan sido todavía descritos podrían jugar un papel fundamental.

Para terminar, cabe señalar que, a pesar de que pueda haber mecanismos que escapen de nuestras técnicas de rastreo y de que las mutaciones en genes del metabolismo y porinas puedan ser claves para explicar algunas de las resistencias, los métodos empleados permiten la detección de TGH en frecuencias elevadas en los pacientes hospitalizados con leucemia aguda. Esta elevada frecuencia podría estar relacionada con la presencia de compuestos que se ha descrito que favorecen la TGH, entre ellos la ingesta de antibióticos, debido a mecanismos como la producción de radicales libres de oxígeno, la inducción de los sistemas de respuesta tipo SOS, el aumento de la permeabilidad de la membrana celular o el aumento en la expresión de genes relacionados con la conjugación (217). Sería interesante elaborar estudios que nos permitieran identificar la procedencia de este material genético en las células pues, según los resultados obtenidos en los experimentos *ex vivo* de diseminación de plásmidos conjugativos, éste podría provenir de diversas especies bacterianas, algunas incluso filogenéticamente alejadas a la bacteria aceptora (Resultados, apartado 4.1.4.). Nuestros resultados revelan que las bacterias del género *Bacteroides*, comúnmente presentes en la microbiota intestinal humana, presentan una gran

capacidad de aceptación de los plásmidos conjugativos y quizá, por tanto, podrían actuar como reservorio de genes de resistencia a antibióticos. Asimismo, sabemos que este tipo de pacientes se encuentran frecuentemente colonizados por diferentes cepas de enterobacterias (205), las cuales hemos detectado también en los estudios *ex vivo* como bacterias con una alta capacidad de aceptación de los plásmidos estudiados, por lo que podría ocurrir que estuviera habiendo transferencia de EGM entre bacterias de estos grupos. De hecho, un estudio muy reciente con enterobacterias resistentes a carbapenemasas ha demostrado la transferencia de plásmidos entre las enterobacterias de la microbiota intestinal de pacientes hospitalizados mediante el seguimiento de variantes poco frecuentes del plásmido pOXA-48 (206). Los plásmidos pOXA-48 tienen una estructura genómica tan conservada que la probabilidad de que diferentes bacterias conteniendo una variante poco frecuente de este plásmido hayan colonizado al mismo paciente es extremadamente baja, indicando la existencia de fenómenos de TGH de este plásmido en la microbiota. No obstante, este sistema no podría aplicarse al estudio epidemiológico de otros plásmidos más variables u otros genes de resistencia que no presenten una relación tan fuerte como la que existe entre el gen *bla_{oxa-48}* y los plásmidos pOXA-48.

5.3. Estudio de la interacción dieta-microbiota en las infecciones producidas por patógenos multirresistentes.

La microbiota, en su estado natural, ofrece resistencia a la colonización. Sin embargo, alteraciones en su composición hacen que pierda esta protección y permiten la colonización por patógenos. Por otro lado, el proceso de conjugación bacteriana requiere contacto celular y, como ya hemos visto, es dependiente entre otros factores de la densidad de las poblaciones donante y aceptora. Por eso, mecanismos que alteren la composición de la microbiota, permitiendo la expansión de determinadas bacterias (ej. antibióticos, inflamación), podrían favorecer la diseminación de plásmidos conjugativos portadores de genes de resistencia a antibióticos (204).

Existen numerosos estudios que relacionan los tratamientos antibióticos con la pérdida de resistencia a la colonización por patógenos (200) y con un aumento de TGH (16); sin embargo, nuestro trabajo pretende estudiar el efecto de otros factores que puedan generar disbiosis a nivel intestinal, como puede ser el tipo de dieta, en estos procesos.

La dieta ejerce un papel fundamental en la composición de la microbiota intestinal (218). Se ha demostrado que la composición bacteriana del intestino cambia en función de los hábitos alimenticios de forma que dietas ricas en carbohidratos fermentables se relacionan con elevadas abundancias de *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Dorea* y *Roseburia*, entre otros géneros, capaces de fermentar estos azúcares, mientras que dietas ricas en grasas aumentan los organismos resistentes a los ácidos biliares, como *Bilophila* y *Bacteroides* (219). El cambio de estilo de vida de una gran parte de la población hacia la dieta occidental (DO), caracterizada por el elevado consumo de alimentos ultraprocesados que aumentan los niveles de grasas y azúcares simples, tiene importantes efectos en las características taxonómicas, genéticas y metabólicas de nuestra microbiota (79,105).

Por todo ello, consideramos que sería muy interesante el estudio de los efectos de la DO en la colonización por enterobacterias y su posible efecto en el aumento de la TGH *in vivo*. Sorprendentemente, a pesar de que la DO altera la microbiota intestinal, tras 8 semanas de alimentación de ratones con este tipo de dieta, no percibimos una

disminución en la resistencia a la colonización por *E. coli* (Resultados, apartado 4.3.1, figura R30). Podría ocurrir, que las cepas endógenas de *E. coli* no se vean afectadas, o incluso se vean favorecidas por este cambio de dieta, de forma que no permitan la colonización del *E. coli* exógeno, algo similar a lo que observaron Wotzka y colaboradores. En su trabajo se describe que *Salmonella* no es capaz de colonizar el intestino de ratones alimentados con DO cuando éstos presentan en su microbiota cepas de *E. coli* endógenas; sin embargo, en ausencia de *E. coli*, la DO genera una pérdida de la resistencia a la colonización por *Salmonella* (220). Esta hipótesis fue posteriormente corroborada al secuenciar la microbiota de nuestros ratones alimentados con dieta control (DC) y DO, observándose una expansión, no estadísticamente significativa, del género *Escherichia/Shigella* en estos últimos.

Por este motivo, pasamos a testar el efecto de la DO en la resistencia a la colonización por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE), otro patógeno oportunista intestinal multirresistente, que frecuentemente presenta plásmidos conjugativos, y que presenta gran relevancia en infecciones nosocomiales. Además, es un patógeno que nuestro grupo ha estudiado en detalle en los últimos años, principalmente en su capacidad de colonizar el intestino y la capacidad de la microbiota de prevenir su colonización. En esta ocasión, la resistencia a la colonización sí que se vio afectada, de forma que VRE era capaz de colonizar en altos niveles el intestino de ratones alimentados durante 8 semanas con DO a diferencia de los alimentados con DC (Resultados, apartado 4.3.1., figura R31). Es más, los niveles de colonización alcanzados tras el consumo de DO fueron similares a los que se encuentran en el intestino de ratones tratados con estreptomicina (Resultados, apartado 4.3.1., figura R31B). Desafortunadamente, las cepas y condiciones de las que disponemos actualmente no nos posibilitaron el estudio de diseminación de EGM entre cepas de VRE durante la DO en ratones. Actualmente estamos trabajando en ello, seleccionando cepas de VRE que puedan co-colonizar el intestino durante la DO, que presenten plásmidos conjugativos y que presenten distinta resistencia a antibióticos con el fin de poder trazar la diseminación del plásmido de la cepa aceptora a la donadora. Otra alternativa que pensamos también podría realizarse, tal y como hemos descrito en esta tesis, es obtener un plásmido conjugativo que sea estable en

enterococo y que exprese fluorescencia. Cabe destacar que la construcción ya generada en R388 o RP4 no se transfirió de manera eficiente a VRE.

No obstante, el hecho de que la DO favorezca la colonización por VRE nos pareció un resultado lo suficientemente relevante en sí mismo como para continuar estudiándolo en más profundidad. En otros estudios previos se relaciona la DO con un aumento de la colonización intestinal por diversos patógenos como *Salmonella*, *Clostridium* o *Listeria*. En ninguno de ellos el efecto de la dieta era suficiente para permitir la colonización intestinal por parte del patógeno, ya que en el caso de *Clostridium*, además de la dieta, también se administró un antibiótico (22), en el caso de *Salmonella*, se requería una microbiota con ausencia de *E. coli* para que la colonización se pudiera llevar a cabo (220) y, en el tercer caso, *L. monocytogenes* ya era capaz de colonizar el intestino con una dieta control, por tanto la DO favorecía pero no era imprescindible para la colonización intestinal (65).

La relevancia de nuestros resultados radica en que, en el caso del enterococo, los ratones que reciben la dieta control son completamente resistentes a la colonización intestinal por VRE, mientras que la DO permite la colonización de VRE en ausencia de otros factores externos (i.e. antibióticos o ausencia de ciertas bacterias comensales como *E. coli*).

Con el fin de explicar como la DO podría favorecer la colonización intestinal y evaluar si los cambios en la microbiota podrían tener un papel en el proceso, analizamos la microbiota de ratones que recibieron la DO. Nuestros resultados mostraron que la DO promueve cambios en la composición global y disminuye la diversidad de la microbiota intestinal (Resultados, apartado 4.3.2., figura R32), en concordancia con lo observado por Sonnenburg y colaboradores al alimentar a los ratones con una dieta pobre en carbohidratos complejos (MAC) (11). Más aún, pudimos observar que los cambios en la composición de la microbiota correlacionan positivamente con los niveles de colonización por VRE detectados en los ratones alimentados durante 8 semanas con DO. Además, el nivel detectado de disrupción de la microbiota era similar al que se produce tras el tratamiento con estreptomicina, acorde con los datos de colonización de VRE tras la administración de este antibiótico.

Para determinar la persistencia de los cambios inducidos por la dieta en la microbiota, tras 8 semanas de DO se alimentó a los ratones con DC durante dos semanas más antes de secuenciar nuevamente la microbiota de las heces. Los resultados obtenidos muestran que existe una recuperación parcial de la diversidad y composición global de la microbiota (Resultados, apartado 4.3.3., figura R33) y una recuperación de la resistencia a la colonización. Estos datos reproducen lo que Wotzka y colaboradores habían observado en su estudio, que un regreso a la DC, en su caso solo 48 h, permite la recuperación de la resistencia a la colonización por *Salmonella* (220). Más concretamente, encontramos una respuesta diferencial al cambio de dieta según el género bacteriano observado; algunas bacterias que aumentaban (*Acetatifactor*, *Akkermansia*, *Hydrogenoanaerobacterium*, *Prevotella* o *Clostridium* sensu estricto) o disminuían (*Barnesiella* y *Clostridium* XIV) su abundancia relativa tras el tratamiento con DO, recuperan niveles similares a los encontrados en ratones alimentados con DC. Estas bacterias podrían ejercer un papel importante en la resistencia de la microbiota frente a la colonización por VRE pues, paralelamente a la recuperación de su abundancia relativa, con el cambio de dieta se recupera también la resistencia a la colonización por el patógeno (Resultados, apartado 4.3.3., figuras R33 y R34). Sin embargo, existen otros géneros bacterianos (*Anaeroplasma*, *Alloprevotella*, *Vampirovibrio* y *Turcibacter*) cuya abundancia relativa, disminuida tras la DO, no se recupera tras dos semanas de alimentación con DC (Resultados, apartados 4.3.3., figura R34) probablemente porque dichas bacterias hayan sido totalmente eliminadas del intestino durante la administración de la DO, lo que nos muestra que ciertos cambios en la microbiota producidos por la DO pueden ser irreversibles. Estos resultados concuerdan nuevamente con los estudios de Sonnenburg realizados con una dieta pobre en MAC, en los que estudiaban la heredabilidad y permanencia de los cambios durante sucesivas generaciones observando que algunas bacterias pertenecientes a los taxones Bacteroidales y Clostridiales no conseguían recuperarse al volver a una dieta rica en MAC (11).

En nuestro caso, un análisis de correlación entre las abundancias de las bacterias afectadas por la DO y los niveles de colonización de VRE evidenció un par de géneros con correlación significativa: *Barnesiella* y *Clostridium*, lo que sugiere que

estas bacterias podrían ejercer un papel clave en la colonización por el patógeno. Los ratones con una mayor abundancia de *Barnesiella* parecen ser más resistente a VRE durante la DO al contrario de lo que sucede con *Clostridium* (Resultados, apartado 4.3.3, figura R34D). Estudios previos de nuestro grupo de investigación habían identificado una asociación entre la presencia de *Barnesiella* y la resistencia a la colonización por VRE tanto en ratones tratados con antibióticos como en pacientes hospitalizados (20), y nuestros resultados con la DO parecen seguir la misma tendencia.

Además de plantearnos si la DO producía cambios en la microbiota que promovían la colonización de VRE, también nos planteamos si dichos cambios en la microbiota podrían ser transmisibles a la descendencia y como afectarían a la capacidad de VRE de colonizar el intestino. Cabría esperar, según los resultados del grupo de Sonnenburg de heredabilidad de los cambios en la microbiota producida por la DO, que las crías de madres alimentadas con DO tuvieran una menor resistencia a la colonización que las crías de ratones alimentados con DC independientemente del tipo de dieta recibida tras el destete. Para demostrarlo, las crías de madres alimentadas con DO fueron separadas en dos grupos tras el destete: uno de ellos se mantuvo en DO mientras que otro fue alimentado con DC.

Sorprendentemente, nos resultó muy complicado obtener crías a partir de madres alimentadas con DO. Detectamos que las hembras quedaban preñadas y parían a sus crías sin diferencias con las hembras alimentadas con DC; sin embargo, las madres alimentadas con DO mataban a las crías logrando muy pocas sobrevivir hasta el día del destete. Es curioso que en el trabajo de Sonnenburg no se comente nada a este respecto (11), por lo que este comportamiento podría estar ligado a los altos niveles de grasa de nuestra dieta, pues una dieta deficiente en azúcares complejos, pero con niveles similares de grasa (la dieta utilizada por el estudio de Sonnenburg) no parece tener los mismos efectos. Estudios recientes han relacionado la DO y dietas ricas en grasas y azúcares con un aumento en los marcadores de estrés hipotalámicos y con cambios en el comportamiento de los ratones, alterando sus niveles de ansiedad y propiciando comportamientos compulsivos (221,222). Sabemos que, ante situaciones de estrés como la falta de alimento o la presencia de un depredador, los roedores

reaccionan matando a sus crías. Unos niveles mantenidos de estrés con motivo de la dieta administrada podrían ser la causa de este comportamiento. Por otro lado, cabe señalar que esta DO, debido a su alto contenido en grasa, no puede ser administrada a los ratones en la forma tradicional de pellets ilimitados, sino que colocamos la pasta sobre un comedero en el interior de la jaula del animal, reponiéndola cada 2-3 días. Este tipo de comida se ha relacionado con mayores niveles de suciedad y amonio en el interior de las jaulas de los animales (223). Además, los roedores valoran la viabilidad de su camada en función del alimento disponible en el momento, por lo que el hecho de percibir un descenso en la cantidad de alimento disponible o la mayor manipulación de su entorno para colocar la comida podría ser interpretado como una situación de estrés que podría desencadenar esta respuesta de canibalismo en la madre. En cualquier caso, sí que fuimos capaces de obtener algunas crías viables para realizar el experimento. Los resultados obtenidos mostraron que aquellas crías provenientes de madres que fueron alimentadas con DO y tras el destete fueron alimentadas con DC presentaron cambios permanentes en su microbiota (algunas de las bacterias cuya abundancia disminuyó en las madres alimentadas con una DO no se recuperaron, i.e. *Alloprevotella* y *Vampirovibrio*). Estos resultados estarían en concordancia con el estudio de Sonnenburg (11). Sin embargo, el nivel de otras bacterias sí se recuperó tras administrar de nuevo la DC. Por ejemplo, los ratones fueron capaces de recuperar parcialmente la diversidad de su microbiota y recuperaron unos niveles de *Clostridium* y *Barnesiella* similares a los que se observan en ratones alimentados con DC. En concordancia con esta recuperación parcial de la microbiota, los ratones recuperaron también la resistencia a la colonización intestinal por VRE (Resultados, apartado 4.3.4, figura R35). En resumen, estos resultados indicaban que, al menos en ratones, la pérdida de resistencia a la colonización no era transmisible de generación en generación a no ser que se mantuviera la administración de la DO.

En los trabajos publicados hasta el momento en los que se relaciona la DO con un aumento en la colonización por patógenos se intenta dar respuesta al mecanismo mediante el cual estos dos factores se relacionan. En el caso de *Salmonella*, ratones sin *E. coli* son alimentados con una dieta rica en grasas, comenzando el día previo a la infección con el patógeno. La grasa de la dieta hace que se liberen altas cantidades de

sales biliares al intestino, para las cuales *Salmonella* es resistente al igual que el resto de las enterobacterias, a diferencia de otros muchos miembros de la microbiota intestinal que son sensibles a estas sales biliares. Estas sales biliares no producen inflamación intestinal ni son necesarias para el crecimiento del patógeno, por lo que se sugiere que se trata simplemente de la interrupción de la microbiota generada a consecuencia de la susceptibilidad a los ácidos biliares la que permite una expansión de *Salmonella* en el intestino. La suplementación de la DC bien con grasas, bien con ácido oleico, un ácido graso insaturado derivado del metabolismo de las grasas, bien con sales biliares, tiene la misma capacidad de promover la colonización por *Salmonella* en ratones libres de *E. coli* (220).

En el caso del trabajo de Hryckowian, estudiaron la eliminación de *C. difficile* del intestino de ratones colonizados tras la administración de distintos tipos de dietas y el cese del tratamiento antibiótico que permite a *C. difficile* colonizar y persistir en el intestino (22). En condiciones normales, una vez se elimina la presión del tratamiento antibiótico, la microbiota que se recupera sería capaz de eliminar al patógeno en unos días. Sin embargo, en este estudio observaron que el consumo de una dieta pobre en carbohidratos complejos (MAC) hace que la infección perdure en el tiempo. Más aun, la adición de MAC, o simplemente de inulina, en la dieta de los ratones restaura la resistencia a la colonización. En este caso, puesto que la adición de MAC o inulina producía cambios muy distintos en la microbiota y afectaba de manera similar a la eliminación del patógeno, los autores sugirieron que la eliminación del patógeno no se debía al cambio a la microbiota sino a la acción *per se* de la dieta. La hipótesis que sugieren en este trabajo es que una dieta pobre en MAC carece del sustrato para la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), unos metabolitos derivados del consumo de MAC por parte de bacterias anaeróbicas, que son capaces de inhibir directamente el crecimiento de *Clostridium* (al menos *in vitro*).

Respecto al mecanismo por el cual la DO podría promover la colonización de VRE, al igual que para el caso de *Clostridium*, pensamos que los AGCC podrían tener un papel relevante. Estudios preliminares de nuestro grupo han detectado: (i) una reducción de la concentración de AGCC en ratones alimentados con DO, (ii) los AGCC son capaces de inhibir el crecimiento de VRE *in vitro*, (iii) la administración de AGCC en

el agua de bebida de los ratones alimentados con DO disminuye los niveles de colonización de VRE. Sin embargo, y a diferencia del trabajo de Hryckowian, nuestro estudio sugiere que los cambios en la microbiota, y concretamente de ciertas bacterias comensales también tiene un papel importante en el establecimiento de la resistencia a la colonización. Es posible que ambos factores influyan en este caso. Por un lado, la falta de azúcares complejos disminuye el sustrato necesario para la producción de AGCC. Por otro lado, las abundancia de bacterias productoras de AGCC disminuye ya que no tienen el sustrato para su crecimiento. Futuros experimentos nos permitirán establecer si existe una relación entre *Barnesiella* y la producción de AGCC, de forma que el descenso en los niveles de esta bacteria disminuiría la producción de AGCC permitiendo la colonización por VRE. Además de la producción de AGCC, existen otros mecanismos por los cuales *Barnesiella* podría estar ejerciendo su poder protector. Por ejemplo, mediante la producción de alguna sustancia, independiente de su metabolismo, que inhiba de forma directa a VRE como está descrito que ocurre con *Blautia* (224) o por competición por nutrientes como parece que ocurre en el caso de *Olsenella*, que compite por la fructosa afectando a la capacidad de crecimiento y colonización por VRE (101). En relación con el papel protector que podría tener *Barnesiella*, en nuestro grupo hemos detectado que *Barnesiella* es capaz de disminuir significativamente los niveles de VRE del intestino de ratones tratados con vancomicina. Actualmente estamos trabajando para esclarecer el mecanismo exacto por el cual *Barnesiella* ejerce su papel protector.

Otro mecanismo alternativo al ya sugerido (i.e. producción de AGCC) sería un posible efecto de la dieta *per se*. La DO que administramos a nuestros ratones contiene elevados niveles de grasas y azúcares simples. Estudios previos de nuestro grupo (101) sugieren que los altos niveles de fructosa disponibles en el intestino favorecen la colonización por VRE. En este caso, el mecanismo que favorece la colonización sería directo (la dieta promueve directamente el crecimiento de VRE) y no tendría porqué depender de los cambios en la microbiota.

Con el objetivo de determinar la importancia de los cambios en la microbiota intestinal independientemente del efecto directo de la dieta en la colonización por VRE realizamos un experimento de trasplante fecal. Brevemente, se restauró la microbiota

de ratones alimentados con DC que habían sido sometidos a un intenso tratamiento antibiótico (21) con microbiota de ratones alimentados bien con DC, bien con DO. De esta forma conseguimos reproducir la disbiosis causada por la DO en ausencia de ese tipo de dieta. Tras la secuenciación de la microbiota y la infección con VRE se determinó que los ratones restaurados con microbiota proveniente de ratones alimentados con DO presentan menor diversidad bacteriana, menores niveles de *Barnesiella*, mayor abundancia de *Clostridium* y niveles más altos de colonización por el patógeno que los observados en los ratones trasplantados con microbiota proveniente de la alimentación con DC (Resultados, apartado 4.3.5., figura R36). Estos resultados sugieren que cambios producidos por la DO en la microbiota podría jugar un papel fundamental en la colonización por VRE, independientemente de la presencia de la dieta. Cabe destacar que los trasplantes fecales han sido aprobados y están siendo utilizados para el tratamiento de algunas infecciones, especialmente las infecciones persistentes por *C. difficile* (118). Sin embargo, debemos recalcar la importancia de la elección del donador, no solo por los posibles patógenos oportunistas, genes de resistencia a antibióticos que pueda contener a modo de reservorio u otros tipos de problemas que están siendo discutidos en estos últimos años, sino también porque, según nuestros datos, la microbiota de donantes que recibían una DO quizá no sea tan eficaz a la hora de reestablecer una microbiota capaz de eliminar al patógeno.

Por otro lado, se sabe que los tratamientos con antibióticos promueven la colonización por VRE y otras bacterias multirresistentes por disrupción de la microbiota intestinal; sin embargo, estudios clínicos han demostrado que, en ocasiones, algunos pacientes que no han sido expuestos a tratamientos antibióticos pueden estar también colonizados por bacterias multirresistentes (171). Nuestro trabajo sugiere que la dieta consumida por estos pacientes podría explicar este fenómeno de colonización intestinal, al igual que podría estar favoreciendo a otros patógenos que requieren situaciones de disbiosis para la colonización intestinal. La realización de nuevos estudios con pacientes podría ayudarnos a responder a la cuestión del efecto de la dieta en humanos y la predisposición a la colonización por patógenos multirresistentes.

6. Conclusiones

- La expresión del gen *sfgfp* bajo la regulación de un promotor inducible codificado por un plásmido conjugativo permite estudiar la diseminación de elementos genéticos móviles entre bacterias en condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, el gen *ytvA* no aporta fluorescencia suficiente para estudiar dicha diseminación.
- La población bacteriana donde son capaces de transferirse *ex vivo* los plásmidos conjugativos diseñados presenta una composición distinta y una diversidad menor que la población bacteriana aceptora utilizada (microbiota fecal o murina).
- Los plásmidos conjugativos utilizados (R388 y RP4) son capaces de transferirse *ex vivo* desde *Escherichia coli* a bacterias pertenecientes a todos los filos más abundantes de la microbiota intestinal humana y murina (Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria).
- Los géneros bacterianos de la microbiota murina a los que más frecuentemente se transfieren *ex vivo* los plásmidos conjugativos testados pertenecen en su mayoría al filo Proteobacteria, siendo los más frecuentes aquellos pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria y Alphaproteobacterias, tales como *Pseudomonas* y *Bradyrhizobium*. Además, los plásmidos conjugativos testados también se transfieren frecuentemente a géneros de la microbiota murina pertenecientes a otros taxones filogenéticamente distantes de la bacteria donadora, incluyendo *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacteroides*.
- En el caso de la microbiota humana, se detectó una mayor eficiencia de transferencia de los plásmidos conjugativos testados a otras enterobacterias, incluyendo los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Raoultella* y *Salmonella*, así como a los géneros *Clostridium XIVa*, *Dorea* y *Bacteroides* pertenecientes a taxones filogenéticamente más distantes.

Estudio de la diseminación de elementos genéticos móviles en la microbiota intestinal

- La herramienta diseñada también es capaz de detectar transferencia de elementos genéticos móviles *in vivo* utilizando un modelo de ratón basado en antibioterapia y trasplante fecal humano.
- La secuenciación de genomas y el cálculo del número de diferencias nucleotídicas entre aislados clínicos obtenidos de manera secuencial de un mismo paciente permiten discriminar entre sucesos de co-colonización o de evolución de enterobacterias multirresistentes *in vivo*.
- El análisis del genoma de cepas clínicas obtenidas de muestras fecales de pacientes hospitalizados sugiere que la adquisición de EGM, incluyendo plásmidos, es un mecanismo de evolución de enterobacterias resistentes que ocurre frecuentemente *in vivo* en el intestino del paciente.
- La detección de múltiples mutaciones en la proteína BamA en aislados clínicos de enterobacterias que han adquirido resistencias a antibióticos sugiere que esta proteína de membrana externa podría ser clave para conferir resistencia a antibióticos betalactámicos *in vivo*.
- La dieta occidental promueve la colonización intestinal de ratones por el patógeno multirresistente enterococo vancomicina resistente (VRE). Por el contrario, no promueve la colonización de *Escherichia coli*. La colonización intestinal de VRE no precisó de la administración adicional de antibióticos, tan solo del cambio de dieta.
- Cambios en la microbiota inducidos por la dieta occidental son suficientes para permitir a VRE colonizar el intestino.
- Algunos de los cambios en la microbiota intestinal inducidos por la dieta occidental persisten tras administrar de nuevo una dieta control. Sin embargo, otros cambios (incluyendo cambios producidos en la abundancia de *Barnesiella* y *Clostridium*) son reversibles. La recuperación parcial de la microbiota tras la

administración de la dieta control confirió de nuevo resistencia a la colonización por VRE.

- La dieta occidental produce cambios permanentes en la microbiota que son transferidos a la descendencia. Sin embargo, la administración de la dieta control a crías de madres alimentadas con dieta occidental permite una restauración parcial de la microbiota que confiere resistencia frente a VRE.
- El análisis de la microbiota junto con experimentos en modelos de ratón recibiendo los distintos tipos de dietas sugieren que *Barnesiella* es una bacteria clave en la resistencia a la colonización frente a VRE.

7. Bibliografía

- (1) Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018 Mar;18(3):318-327.
- (2) Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Hoyen CK, Hanrahan JA, Hujer AM, et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 2000 Dec 28;343(26):1925-1932.
- (3) Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal Domination and the Risk of Bacteremia in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis* 2012;55(7):905-914.
- (4) Liu L, Chen X, Skogerbø G, Zhang P, Chen R, He S, et al. The human microbiome: a hot spot of microbial horizontal gene transfer. *Genomics* 2012 Nov;100(5):265-270.
- (5) Aminov RI. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* 2011 Jul 26;2:158.
- (6) Klümper U, Riber L, Dechesne A, Sannazzarro A, Hansen LH, Sørensen SJ, et al. Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *The ISME journal* 2015 Mar 17;9(4):934-945.
- (7) Drepper T, Eggert T, Circolone F, Heck A, Krauß U, Guterl J, et al. Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nature biotechnology* 2007 Mar 11;25(4):443-445.
- (8) Whitaker WR, Shepherd ES, Sonnenburg JL. Tunable Expression Tools Enable Single-Cell Strain Distinction in the Gut Microbiome. *Cell (Cambridge)* 2017 Apr 20;169(3):538-546.e12.
- (9) Woerther P, Micol J, Angebault C, Pasquier F, Pilorge S, Bourhis J, et al. Monitoring Antibiotic-Resistant Enterobacteria faecal levels is helpful in predicting antibiotic susceptibility of bacteraemia isolates in patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 2015;64.
- (10) Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, et al. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell host & microbe* 2007 Aug;2(2):119-129.
- (11) Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinction in the gut microbiota compounds over generations. 2015 Jan 1;529(7585):212-215.
- (12) Pédelacq J, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS, Cabantous S. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 2006 Jan;24(1):79-88.

- (13) Lee SM, Donaldson GP, Mikulski Z, Boyajian S, Ley K, Mazmanian SK. Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature* 2013 Sep 19;;501(7467):426-429.
- (14) Vital M, Karch A, Pieper DH. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. *mSystems* 2017 Nov;2(6):130.
- (15) Magiorakos A-, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection* 2012 Mar;18(3):268-281.
- (16) Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 2004 Jan 1;427(6969):72-74.
- (17) Lehman KM, Grabowicz M. Countering Gram-Negative Antibiotic Resistance: Recent Progress in Disrupting the Outer Membrane with Novel Therapeutics. *Antibiotics (Basel)* 2019 Sep 24;8(4):163. doi: 10.3390/antibiotics8040163.
- (18) Lopatkin AJ, Bening SC, Manson AL, Stokes JM, Kohanski MA, Badran AH, et al. Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance.
- (19) Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science (American Association for the Advancement of Science)* 2011 Sep 1;;334(6052):105-108.
- (20) Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, et al. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun* 2013 Mar;81(3):965-973.
- (21) Staley C, Kaiser T, Beura LK, Hamilton MJ, Weingarden AR, Bobr A, et al. Stable engraftment of human microbiota into mice with a single oral gavage following antibiotic conditioning. *Microbiome* 2017;5(1):87.
- (22) Hryckowian AJ, Van Treuren W, Smits SA, Davis NM, Gardner JO, Bouley DM, et al. Microbiota Accessible Carbohydrates Suppress *Clostridium difficile* in a Murine Model. 2018; Available at: <https://search.datacite.org/works/10.1101/243253>.
- (23) Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum* 2016 Apr 1;;4(2).
- (24) Esparza Olcina MJ. Guía-ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico [en línea] [actualizado el 22/11/2008]. Available at: [en http://www.guia-abe.es](http://www.guia-abe.es).
- (25) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC. Antimicrobial Resistance. Tackling the burden in the European Union. Briefing note for EU/EEA countries. 2019 Paris,.

- (26) Pagès J, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008 Dec;6(12):893-903.
- (27) Fernández-Rodríguez R. Resistencia bacteriana a los antibióticos: un problema mundial de salud pública. *Galicia-clinica* 2017;78(3):114-115.
- (28) Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2014 Jul;124(7):2836-2840.
- (29) Strong D, Whelan AM. Editorial. *Ecology* 2018 Apr;99(4):773.
- (30) Shrestha D, Maharjan B, Thida Oo NA, Isoda N, Nakajima C, Suzuki Y. Molecular analysis of streptomycin-resistance associating genes in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Nepal. *Tuberculosis (Edinb)* 2020 August 08;125:101985.
- (31) McInnes RS, McCallum GE, Lamberte LE, van Schaik W. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current opinion in microbiology* 2020 Mar 3,;53:35-43.
- (32) Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 1928 January 01;27(2):113-159.
- (33) Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 2005 Sep;3(9):711-721.
- (34) Charpentier X, Polard P, Claverys J. Induction of competence for genetic transformation by antibiotics: convergent evolution of stress responses in distant bacterial species lacking SOS? *Current opinion in microbiology* 2012 Oct;15(5):570-576.
- (35) Sibold C, Henrichsen J, König A, Martin C, Chalkley L, Hakenbeck R. Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Molecular microbiology* 1994 Jun;12(6):1013-1023.
- (36) Luz Balsalobre, María José Ferrándiz, Josefina Liñares, Fe Tubau, Adela G. de la Campa. Viridans Group Streptococci Are Donors in Horizontal Transfer of Topoisomerase IV Genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003 Jul 1,;47(7):2072-2081.
- (37) Domingues S, Harms K, Fricke WF, Johnsen PJ, da Silva GJ, Nielsen KM. Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrons and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLoS pathogens* 2012 Aug 2,;8(8):e1002837.
- (38) Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic Treatment Expands the Resistance Reservoir and Ecological Network of the Phage Metagenome. 2013 Jun 1,;499(7457):219-222.

- (39) von Wintersdorff C, Penders J, van Niekerk J, Mills ND, Majumder S, van Alphen L, et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology* 2016 Feb 19;;7:173.
- (40) Mazaheri Nezhad Fard R, Barton MD, Heuzenroeder MW. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Letters in applied microbiology* 2011 Jun;52(6):559-564.
- (41) Billard-Pomares T, Fouteau S, Jacquet ME, Roche D, Barbe V, Castellanos M, et al. Characterization of a P1-Like Bacteriophage Carrying an SHV-2 Extended-Spectrum β -Lactamase from an *Escherichia coli* Strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014 Nov;58(11):6550-6557.
- (42) Barry Marris. Genetic Recombination in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1974 Mar 1;;71(3):971-973.
- (43) Stanton TB. Prophage-like gene transfer agents—Novel mechanisms of gene exchange for *Methanococcus*, *Desulfovibrio*, *Brachyspira*, and *Rhodobacter* species. *Anaerobe* 2007;13(2):43-49.
- (44) Lang AS, Zhaxybayeva O, Beatty JT. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nature reviews. Microbiology* 2012 Jun 11;;10(7):472-482.
- (45) Anders Norman, Lars H. Hansen, Søren J. Sørensen. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical transactions. Biological sciences* 2009 Aug 12;;364(1527):2275-2289.
- (46) Wozniak RAF, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature reviews. Microbiology* 2010 Jul 5;;8(8):552-563.
- (47) Meyer R. Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid* 2009 Sep;62(2):57-70.
- (48) Davison J. Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. *Plasmid* 1999;42(2):73-91.
- (49) Musovic S, Oregaard G, Kroer N, Sorensen SJ. Cultivation-Independent Examination of Horizontal Transfer and Host Range of an IncP-1 Plasmid among Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Indigenous to the Barley Rhizosphere. *Applied and environmental microbiology* 2006 Oct 4;;72(10):6687-6692.
- (50) Roberts AP, Mullany P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends in microbiology (Regular ed.)* 2009 Jun;17(6):251-258.

7. Bibliografía

- (51) Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC genomics* 2015 Nov 17;;16(1):964.
- (52) Paulsson J. Multileveled Selection on Plasmid Replication. *Genetics* 2002 Aug 1;;161(4):1373-1384.
- (53) Thompson R., Taylor L., Kelly K., Everett R., Willetts N. When phages cloned oriT were cells, F, genomes contained nick lying T and, using this assay, the traY, traZ were shown to be essential, E W, et al.
- (54) Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F. Mobility of Plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews* 2010 Aug 30;;74(3):434-452.
- (55) Thomas CM. Paradigms of plasmid organization. *Mol Microbiol* 2000 Aug;37(3):485-491.
- (56) Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* 2012;3:110.
- (57) Woerther P-, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clinical microbiology reviews* 2013 Oct 3;;26(4):744-758.
- (58) Hartmann A, Locatelli A, Amoureux L, Depret G, Jolivet C, Gueneau E, et al. Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region). *Frontiers in microbiology* 2012;3:83.
- (59) Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and drug resistance* 2014 Jun;7:167-176.
- (60) Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology* 2013;303(6):298-304.
- (61) Liu Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases* 2016 Feb;16(2):161-168.
- (62) Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 2006 Jul;8(7):1137-1144.
- (63) Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist* 2015 Apr 1;8:49-61.

- (64) Holmberg SD, Wells JG, Cohen ML. Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant Salmonella: investigations of U.S. outbreaks, 1971-1983. *Science* 1984 Aug 24;225(4664):833-835.
- (65) Brinkac L, Voorhies A, Gomez A, Nelson KE. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microb Ecol* 2017 May 11;74(4):1001-1008.
- (66) Hocquet D, Muller A, Bertrand X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J Hosp Infect* 2016 Aug;93(4):395-402.
- (67) Hansen TA, Joshi T, Larsen AR, Andersen PS, Harms K, Mollerup S, et al. Vancomycin gene selection in the microbiome of urban *Rattus norvegicus* from hospital environment. *Evol Med Public Health* 2016 Aug 3;2016(1):219-226.
- (68) Larsson DG, de Pedro C, Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Mater* 2007 Sep 30;148(3):751-755.
- (69) Sørensen SJ. Transfer of plasmid RP4 from *Escherichia coli* K-12 to indigenous bacteria of seawater. *Microb Releases* 1993 Dec;2(3):135-141.
- (70) Inoue D, Sei K, Soda S, Ike M, Fujita M. Potential of predominant activated sludge bacteria as recipients in conjugative plasmid transfer. *J Biosci Bioeng* 2005 Dec;100(6):600-605.
- (71) Shintani M, Matsui K, Inoue J, Hosoyama A, Ohji S, Yamazoe A, et al. Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol* 2014 Jan;80(1):138-145.
- (72) Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature* 2011 Oct 30;480(7376):241-244.
- (73) Blake DP, Hillman K, Fenlon DR, Low JC. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *J Appl Microbiol* 2003;95(3):428-436.
- (74) Andremont A. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News* 2003;69:601-607.
- (75) Poirel L, Kämpfer P, Nordmann P. Chromosome-Encoded Ambler Class A - Lactamase of *Kluyvera georgiana*, a Probable Progenitor of a Subgroup of CTX-M Extended-Spectrum -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;46:4038-40.
- (76) Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Aug;49(8):3523-3525.

- (77) Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 2009 Aug 28;325(5944):1128-1131.
- (78) Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science (American Association for the Advancement of Science)* 2005 Jun 10;308(5728):1635-1638.
- (79) Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science translational medicine* 2009 Nov 11;1(6):6ra14.
- (80) von Martels, Julius Z. H., Sadaghian Sadabad M, Bourgonje AR, Blokzijl T, Dijkstra G, Faber KN, et al. The role of gut microbiota in health and disease: In vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut. *Anaerobe* 2017;44:3-12.
- (81) Pamer EG. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science (American Association for the Advancement of Science)* 2016 Apr 28;352(6285):535-538.
- (82) Johansson MV, Jakobsson H, Holmén-Larsson J, Schütte A, Ermund A, Rodríguez-Piñeiro A, et al. Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell host & microbe* 2015 Nov;18(5):582-592.
- (83) Bauer H., Horowitz RE., Levenson SM., Popper H. The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. *Studies on germfree mice. Am J Pathol* 1963 Apr;42(4):471-83.
- (84) Zelante T, Iannitti R, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, et al. Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Immunity (Cambridge, Mass.)* 2013 Aug;39(2):372-385.
- (85) Ubeda C, Djukovic A, Isaac S. Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clinical & translational immunology* 2017;6(2):e128-n/a.
- (86) Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell (Cambridge)* 2009 Oct;139(3):485-498.
- (87) Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, et al. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell (Cambridge)* 2015 Oct;163(2):367-380.
- (88) Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science (American Association for the Advancement of Science)* 2010 Dec 23;331(6015):337-341.

- (89) Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature (London)* 2013 Jul 10;;500(7461):232-236.
- (90) Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science (American Association for the Advancement of Science)* 2013 Jul 4;;341(6145):569-573.
- (91) Kim CH. B cell-helping functions of gut microbial metabolites. *Microb Cell* 2016 Sep 23;;3(10):529-531.
- (92) Zeng MY, Cisalpino D, Varadarajan S, Hellman J, Warren HS, Cascalho M, et al. Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. *Immunity (Cambridge, Mass.)* 2016 Mar;44(3):647-658.
- (93) Sassone-Corsi M, Nuccio SP, Liu H, Hernandez D, Vu CT, Takahashi AA, et al. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature* 2016 December 08;540(7632):280-283.
- (94) Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, Chakraborty R, Hayward M, Simpson P, et al. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature* 2015 Oct 29;;526(7575):719-722.
- (95) Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 2015 January 08;517(7533):205-208.
- (96) Suzuki M., Morishita Y., Shin R. Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of medical microbiology* 2002 Mar 1;;51(3):201-206.
- (97) Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, Cohen PS, Conway T. Nutritional Basis for Colonization Resistance by Human Commensal *Escherichia coli* Strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the Mouse Intestine. *PloS one* 2013;8(1):e53957.
- (98) Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis* 2004 July 15;39(2):219-226.
- (99) Panda S, El khader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, et al. Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. *PLoS One* 2014 -4-18;9(4).
- (100) Isaac S, Scher JU, Djukovic A, Jiménez N, Littman DR, Abramson SB, et al. Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 2017 Jan;72(1):128-136.
- (101) Isaac S, Flor-Duro A, Puchades-Carrasco L, Lopez-Nogueroles M, Pineda-Lucena A, García-Garcerá M, et al. Microbiome-

mediated fructose depletion restricts gut colonization by a multi drug resistant pathogen. *Nature Communications*. Artículo en revisión.

(102) Theriot CM, Koenigsnecht MJ, Carlson PE, Hatton GE, Nelson AM, Li B, et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nature communications* 2014;5(1):3114.

(103) Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 2008 Dec;70(4):298-304.

(104) Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut* 2013 Nov;62(11):1591-1601.

(105) David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature (London)* 2013 Dec 11;505(7484):559-563.

(106) Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature (London)* 2012 Jul 13;488(7410):178-184.

(107) De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 2010 Aug 2;107(33):14691-14696.

(108) Tilg H, Moschen AR. Food, Immunity, and the Microbiome. *Gastroenterology (New York, N.Y. 1943)* 2015 May;148(6):1107-1119.

(109) Nagel G, Weinmayr G, Kleiner A, Garcia-Marcos L, Strachan DP. Effect of diet on asthma and allergic sensitisation in the International Study on Allergies and Asthma in Childhood (ISAAC) Phase Two. *Thorax* 2010 Jun;65(6):516-522.

(110) Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of clinical investigation* 2011 Jun 1;121(6):2126-2132.

(111) Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008 Jun;57(6):1470-1481.

(112) Agus A, Denizot J, Thévenot J, Martinez-Medina M, Massier S, Sauvanet P, et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Scientific reports* 2016 Jan 8;6(1):19032.

- (113) Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Billard E, Bonnet R, et al. Western diet induces dysbiosis with increased E coli in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* 2014 Jan;63(1):116-124.
- (114) Sundaram V, Kaung A, Rajaram A, Lu SC, Tran TT, Nissen NN, et al. Obesity is independently associated with infection in hospitalised patients with end-stage liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2015 Dec;42(11-12):1271-1280.
- (115) Wu G, Zhang C, Wang J, Zhang F, Wang R, Shen J, et al. Diminution of the gut resistome after a gut microbiota-targeted dietary intervention in obese children. *Scientific reports* 2016 Apr 05;6(1):24030.
- (116) Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007 Oct;5(10):2177-2189.
- (117) Zeltner B, Dealer TP. Cleveland Clinic announces Top Ten Medical Innovations of 2014. 2013; Available at: https://www.cleveland.com/healthfit/2013/10/cleveland_clinic_announces_top.html. Accessed Nov 11, 2020.
- (118) Landy J, Al-Hassi H, Mclaughlin S, Walker A, Ciclitira P, Nicholls R, et al. Review article: Faecal transplantation therapy for gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:409-15.
- (119) Aroniadis OC, Brandt LJ, Oneto C, Feuerstadt P, Sherman A, Wolkoff AW, et al. Faecal microbiota transplantation for diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019 Sep;4(9):675-685.
- (120) Allegretti JR, Kassam Z, Hurtado J, Marchesi JR, Mullish BH, Chiang A, et al. Impact of fecal microbiota transplantation with capsules on the prevention of metabolic syndrome among patients with obesity. *Hormones (Athens)* 2021 Jan 9.
- (121) Rachid R, Stephen-Victor E, Chatila TA. The microbial origins of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2020 Dec 22.
- (122) Merrick B, Robinson E, Bunce C, Allen L, Bisnauthsing K, Izundu CC, et al. Faecal microbiota transplant to ERadicate gastrointestinal carriage of Antibiotic Resistant Organisms (FERARO): a prospective, randomised placebo-controlled feasibility trial. *BMJ Open* 2020 May 25;10(5):e038847.
- (123) Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews. Immunology* 2013 Oct 7;13(11):790-801.
- (124) Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, Wuertz S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature reviews. Microbiology* 2005 Sep;3(9):700-710.

- (125) Fox RE, Zhong X, Krone SM, Top EM. Spatial structure and nutrients promote invasion of IncP-1 plasmids in bacterial populations. *The ISME Journal* 2008 Jun 5;;2(10):1024-1039.
- (126) Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* 1995;59(1):143-169.
- (127) Prendergast FG, Mann KG. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskålea*. *Biochemistry* 1978 Aug 22;17(17):3448-3453.
- (128) Sørensen SJ, Sørensen AH, Hansen LH, Oregaard G, Veal D. Direct detection and quantification of horizontal gene transfer by using flow cytometry and gfp as a reporter gene. *Curr Microbiol* 2003 Aug;47(2):129-133.
- (129) Hebisch E, Knebel J, Landsberg J, Frey E, Leisner M. High Variation of Fluorescence Protein Maturation Times in Closely Related *Escherichia coli* Strains. *PLoS one* 2013;8(10):e75991.
- (130) Doublet B, Douard G, Targant H, Meunier D, Madec J, Cloeckart A. Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *Journal of Microbiological Methods* 2008;75(2):359-361.
- (131) Datta N., Hedges RW. Compatibility Groups among ϕ - R Factors. *Nature* 1971;234(5326):222-223.
- (132) Fernández-López R, Garcillán-Barcia MP, Revilla C, Lázaro M, Vielva L, de la Cruz F. Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 2006 Nov 1;;30(6):942-966.
- (133) Heinemann JA, Sprague GF. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* 1989;340(6230):205-209.
- (134) Waters VL. Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nat Genet* 2001;29(4):375-376.
- (135) Lowbury EJJ, Lilly HA, Kidson A, Ayliffe GAJ, Jones RJ. Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics: Emergence of strains highly resistant to carbenicillin. *The Lancet* 1969;294(7618):448-452.
- (136) Lessl M, Balzer D, Lurz R, Waters VL, Guiney DG, Lanka E. Dissection of IncP conjugative plasmid transfer: definition of the transfer region Tra2 by mobilization of the Tra1 region in trans. *J Bacteriol* 1992;174(8):2493-2500.

(137) Thompson JA, Oliveira RA, Djukovic A, Ubeda C, Xavier KB. Manipulation of the quorum sensing signal AI-2 affects the antibiotic-treated gut microbiota. *Cell Rep* 2015 Mar 24;10(11):1861-1871.

(138) Francés-Cuesta C, Sánchez-Hellín V, Gomila B, González-Candelas F. Is there a widespread clone of *Serratia marcescens* producing outbreaks worldwide? *J Hosp Infect* 2021 Feb;108:7-14.

(139) Maniatis T., Fritsch EF., Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 10th ed.: Cold Spring Harbor Lab; 1984.

(140) Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 1988 Jul 11;16(13):6127-6145.

(141) Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6640-6645.

(142) Mutalik VK, Guimaraes JC, Cambray G, Lam C, Christoffersen MJ, Mai QA, et al. Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. *Nat Methods* 2013 Apr;10(4):354-360.

(143) Gibson DG, Young L, Chuang R, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 2009;6(5):343-345.

(144) S. Isaac. *Role of the microbiota in the defense against infections by Enterococci* Universitat de València-FISABIO; 2017.

(145) Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016 Jul;13(7):581-583.

(146) Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007 Aug;73(16):5261-5267.

(147) Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2005 Dec;71(12):8228-8235.

(148) Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis* 2015;26:27663.

(149) Benjamini Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. Article in *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Methodological* 1995 -11.

- (150) Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 2016 Oct 1;32(19):3047-3048.
- (151) Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011 Mar 15;27(6):863-864.
- (152) Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 2017 Jun 8;13(6):e1005595.
- (153) Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014 Jul 15;30(14):2068-2069.
- (154) Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013 Apr 15;29(8):1072-1075.
- (155) Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 2016;44:W16-W21.
- (156) Grüning B, Dale R, Sjödin A, Chapman BA, Rowe J, Tomkins-Tinch CH, et al. Bioconda: sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences. *Nat Methods* 2018 Jul;15(7):475-476.
- (157) Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 2015 Jan;32(1):268-274.
- (158) Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 2007 Jan 1;23(1):127-128.
- (159) Hunt M, Mather AE, Sánchez-Busó L, Page AJ, Parkhill J, Keane JA, et al. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microbial Genomics* 2017 -10-01;3(10).
- (160) Huang Y, Niu B, Gao Y, Fu L, Li W. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 2010 Mar 1;26(5):680-682.
- (161) Li H. Minimap and miniasm: fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics* 2016 Jul 15;32(14):2103-2110.
- (162) Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, et al. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 2004;5(2):R12-r12. Epub 2004 Jan 30.
- (163) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990 Oct 5;215(3):403-410.

- (164) Wick RR, Schultz MB, Zobel J, Holt KE. Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics* 2015 Oct 15;31(20):3350-3352.
- (165) Margaret M. C. Lam, Torsten Seemann, Dieter M. Bulach, Simon L. Gladman, Honglei Chen, Volker Haring, et al. Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus faecium* Genome. *Journal of Bacteriology* 2012 May 01;194(9):2334-2341.
- (166) Waters VL. Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front Biosci* 1999 May 1;4:433.
- (167) Potzkei J, Kunze M, Drepper T, Gensch T, Jaeger K, Büchs J. Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor. *BMC biology* 2012 Mar 22;10(1):28.
- (168) Llosa M, Bolland S, de la Cruz F. Structural and functional analysis of the origin of conjugal transfer of the broad-host-range IncW plasmid R388 and comparison with the related IncN plasmid R46. *Mol Gen Genet* 1991 May;226(3):473-483.
- (169) Paulsen VS, Mardirossian M, Blencke HM, Benincasa M, Runti G, Nepa M, et al. Inner membrane proteins YgdD and SbmA are required for the complete susceptibility of *Escherichia coli* to the proline-rich antimicrobial peptide arasin 1(1-25). *Microbiology (Reading)* 2016 Apr;162(4):601-609.
- (170) Poirel L, Héritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Feb;47(2):755-758.
- (171) D'Agata EMC, Varu A, Geffert SF, Araos R, Mitchell S, Situ A, et al. Acquisition of Multidrug-resistant Organisms in the Absence of Antimicrobials. *Clin Infect Dis* 2018 Oct 15;67(9):1437-1440.
- (172) Dominguez-Bello M, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(26):11971-11975.
- (173) Benz F, Huisman JS, Bakkeren E, Herter JA, Stadler T, Ackermann M, et al. Plasmid- and strain-specific factors drive variation in ESBL-plasmid spread in vitro and in vivo.
- (174) Neil K, Allard N, Grenier F, Burrus V, Rodrigue S. Highly efficient gene transfer in the mouse gut microbiota is enabled by the IncI2 conjugative plasmid TP114. *Communications biology* 2020 Sep 22;3(1):523.

- (175) Loftie-Eaton W, Crabtree A, Perry D, Millstein J, Baytosh J, Stalder T, et al. Contagious Antibiotic Resistance: Plasmid Transfer Among Bacterial Residents of the Zebrafish Gut. *Appl Environ Microbiol* 2021 Feb 26.
- (176) Ye RW, Tao W, Bedzyk L, Young T, Chen M, Li L. Downloaded. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 2013;4458.
- (177) Lee KH, Cho MH, Chung T, Chang HN, Lim SH, Lee J. Characterization of an oxygen-dependent inducible promoter, the *Escherichia coli* nar promoter, in gram-negative host strains. *Biotechnol Bioeng* 2003;82(3):271-277.
- (178) Baez A, Majdalani N, Shiloach J. Production of recombinant protein by a novel oxygen-induced system in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* 2014;13(1):50.
- (179) Khosla C, Bailey JE. Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1989;171(11):5995.
- (180) Denu L, Lubin J, Douglas B, Tuluc F, Silverman MA. Diet-induced microbial autofluorescence confounds flow cytometry of ex vivo isolated fecal microbes. *Eur J Immunol* 2019;49(12):2252-2254.
- (181) Galbusera L, Bellement-Theroue G, Urchueguia A, Julou T, Van Nimwegen E. Using fluorescence flow cytometry data for single-cell gene expression analysis in bacteria. *PLoS ONE* 2020 -10-12;15(10).
- (182) Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 2002 Aug 16;297(5584):1183-1186.
- (183) Walker AW, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends Microbiol* 2014;22(5):267-274.
- (184) Price VJ, McBride SW, Hullahalli K, Chatterjee A, Duerkop BA, Palmer KL. *Enterococcus faecalis* CRISPR-Cas Is a Robust Barrier to Conjugative Antibiotic Resistance Dissemination in the Murine Intestine. *mSphere* 2019 Jul 24;4(4):e00464-19.
- (185) San Millan A, Heilbron K, MacLean RC. Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. *ISME J* 2014 Mar;8(3):601-612.
- (186) Dionisio F, Zilhão R, Gama JA. Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid* 2019 Mar;102:29-36.
- (187) Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F. Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* 2008 Jul;60(1):1-18.

- (188) San Millan A, MacLean RC. Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiol Spectr* 2017 Sep;5(5):10.1128/microbiolspec.MTBP-2017.
- (189) Lopatkin AJ, Huang S, Smith RP, Srimani JK, Sysoeva TA, Bewick S, et al. Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nat Microbiol* 2016 Apr 11;1(6):16044.
- (190) Stalder T, Top E. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2016;2:16022.
- (191) Lujan SA, Guogas LM, Ragonese H, Matson SW, Redinbo MR. Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Jul 24;104(30):12282-12287.
- (192) Getino M, Sanabria-Ríos DJ, Fernández-López R, Campos-Gómez J, Sánchez-López JM, Fernández A, et al. Synthetic Fatty Acids Prevent Plasmid-Mediated Horizontal Gene Transfer. *mBio* 2015 Sep 1;6(5):1032.
- (193) Ripoll-Rozada J, García-Cazorla Y, Getino M, Machón C, Sanabria-Ríos D, de la Cruz F, et al. Type IV traffic ATPase TrwD as molecular target to inhibit bacterial conjugation. *Mol Microbiol* 2016 Jun;100(5):912-921.
- (194) De Gelder L, Williams JJ, Ponciano JM, Sota M, Top EM. Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid. *Genetics* 2008 Apr;178(4):2179-2190.
- (195) De Gelder L, Ponciano JM, Joyce P, Top EM. Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology (Reading)* 2007 Feb;153(Pt 2):452-463.
- (196) Gama JA, Zilhão R, Dionisio F. Plasmid Interactions Can Improve Plasmid Persistence in Bacterial Populations. *Frontiers in Microbiology* 2020;11:2033.
- (197) Suzuki H, Yano H, Brown CJ, Top EM. Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *J Bacteriol* 2010 Nov;192(22):6045-6055.
- (198) Yano H, Rogers LM, Knox MG, Heuer H, Smalla K, Brown CJ, et al. Host range diversification within the IncP-1 plasmid group. *Microbiology (Reading)* 2013 Nov;159(Pt 11):2303-2315.
- (199) Bradley DE, Taylor DE, Cohen DR. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1980 Sep;143(3):1466-1470.
- (200) Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *The Journal of clinical investigation* 2010 Dec;120(12):4332-4341.

- (201) Händel N, Otte S, Jonker M, Brul S, ter Kuile BH. Factors that affect transfer of the IncI1 β -lactam resistance plasmid pESBL-283 between *E. coli* strains. *PLoS One* 2015 Apr 1;10(4):e0123039.
- (202) Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005 Feb 28;11(8):1131-1140.
- (203) Freese PD, Korolev KS, Jiménez JI, Chen IA. Genetic drift suppresses bacterial conjugation in spatially structured populations. *Biophys J* 2014 Feb 18;106(4):944-954.
- (204) Stecher B, Denzler R, Maier L, Bernet F, Sanders MJ, Pickard DJ, et al. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 Jan 24;109(4):1269-1274.
- (205) Djukovic A, González-Barberá E.M., Sanz J, Artacho A, Peñaranda I, Herrera B, et al. High Heterogeneity of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae Fecal Levels in Hospitalized Patients Is Partially Driven by Intravenous β -Lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64(2):1415.
- (206) León-Sampedro R, Delafuente J, Díaz-Agero C, Crellen T, Musicha P, Rodríguez-Beltrán J, et al. Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nat Microbiol* 2021 -03-29.
- (207) Guthrie L, Gupta S, Daily J, Kelly L. Human microbiome signatures of differential colorectal cancer drug metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017 Nov 1;3:27-1. eCollection 2017.
- (208) Møller TSB, Liu G, Boysen A, Thomsen LE, Lühje FL, Mortensen S, et al. Treatment with Cefotaxime Affects Expression of Conjugation Associated Proteins and Conjugation Transfer Frequency of an IncI1 Plasmid in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2017 Nov 29;8:2365.
- (209) Lu Y, Zeng J, Wang L, Lan K, E S, Wang L, et al. Antibiotics Promote *Escherichia coli*-*Pseudomonas aeruginosa* Conjugation through Inhibiting Quorum Sensing. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 Nov 22;61(12):e01284-17. Print 2017 Dec.
- (210) Zhang Y, Gu AZ, He M, Li D, Chen J. Subinhibitory Concentrations of Disinfectants Promote the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes within and across Genera. *Environ Sci Technol* 2017 Jan 3;51(1):570-580.
- (211) Lu J, Wang Y, Zhang S, Bond P, Yuan Z, Guo J. Triclosan at environmental concentrations can enhance the spread of extracellular antibiotic resistance genes through transformation. *Sci Total Environ* 2020 Apr 15;713:136621.
- (212) Lu J, Wang Y, Li J, Mao L, Nguyen SH, Duarte T, et al. Triclosan at environmentally relevant concentrations promotes horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across bacterial genera. *Environ Int* 2018 Dec;121(Pt 2):1217-1226.

(213) Wang Y, Lu J, Mao L, Li J, Yuan Z, Bond PL, et al. Antiepileptic drug carbamazepine promotes horizontal transfer of plasmid-borne multi-antibiotic resistance genes within and across bacterial genera. *The ISME journal* 2019;13(2):509-522.

(214) Aihara M, Nishida R, Akimoto M, Gotoh Y, Kiyosuke M, Uchiumi T, et al. Within-host evolution of a *Klebsiella pneumoniae* clone: selected mutations associated with the alteration of outer membrane protein expression conferred multidrug resistance.

(215) Ahmad S, Ranaghan KE, Azam SS. Combating tigecycline resistant *Acinetobacter baumannii*: A leap forward towards multi-epitope based vaccine discovery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2019;132:1-17.

(216) Hart EM, Mitchell AM, Konovalova A, Grabowicz M, Sheng J, Han X, et al. A small-molecule inhibitor of BamA impervious to efflux and the outer membrane permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019 Oct 22;116(43):21748-21757.

(217) Liu Y, Tong Z, Shi J, Jia Y, Yang K, Wang Z. Correlation between Exogenous Compounds and the Horizontal Transfer of Plasmid-Borne Antibiotic Resistance Genes. *Microorganisms (Basel)* 2020 Aug 08;8(8):1211.

(218) Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019 Jan;16(1):35-56.

(219) Dahl WJ, Rivero Mendoza D, Lambert JM. Diet, nutrients and the microbiome. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2020;171:237-263.

(220) Wotzka SY, Kreuzer M, Maier L, Arnoldini M, Nguyen BD, Brachmann AO, et al. *Escherichia coli* limits *Salmonella Typhimurium* infections after diet shifts and fat-mediated microbiota perturbation in mice. *Nat Microbiol* 2019 -10-07;4(12):2164.

(221) Fouesnard M, Zoppi J, Petera M, Le Gleau L, Migné C, Devime F, et al. Dietary switch to Western diet induces hypothalamic adaptation associated with gut microbiota dysbiosis in rats. *Int J Obes (Lond)* 2021 Mar 13.

(222) Júnior REM, de Carvalho LM, Carlos Dos Reis D, Cassali GD, Faria AMC, Maioli TU, et al. Diet-induced obesity leads to alterations in behavior and gut microbiota composition in mice. *J Nutr Biochem* 2021 Mar 8:108622.

(223) Teklad Diets Case study.

(224) Kim SG, Becattini S, Moody TU, Shliaha PV, Littmann ER, Seok R, et al. Microbiota-derived lantibiotic restores resistance against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Nature (London)* 2019 Aug 21;572(7771):665-669.

8. Anexos

Tabla A1. Abundancia relativa de los distintos géneros bacterianos detectados al secuenciar el gen 16S rRNA en los experimentos de conjugación con microbiota cecal murina como población aceptora. Se representa la abundancia relativa de cada género bacteriano y la clase a la que pertenece dicho género. El orden en que se muestran tanto los diferentes géneros detectados (filas) como las diferentes muestras secuenciadas (columnas) coincide con el de la figura R14. Se indican los plásmidos conjugativos utilizados con distintas combinaciones de plásmido (R388 o RP4) y promotor (Ptet o Plac) para dos experimentos diferentes (experimento 1 o Experimento 2), así como la muestra de ciego utilizada como población aceptora (cultivada (C) o no cultivada (NC)).

Taxonomía	Experimento 1						Experimento 2						
	Transconjugantes			Ptet			Transconjugantes			Ptet			
	R388	RP4	RP4	R388	RP4	RP4	R388	RP4	RP4	R388	RP4	NC	C
<i>Actinomyces</i>	0	0	0	0	0	0	0,102922372	0	0	0	0	0	0
<i>Brevibacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,140348689	0	0	0	0	0	0
<i>Cellulomonas</i>	0,482195846	0	0	0	0	0	0,053020616	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i>	3,571428571	11,76074554	0	0	0	0	1,313039953	0	0	22,20277059	0	0	0
<i>Brachybacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dietzia</i>	0,199590222	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Geodermatophilus</i>	0	0	0	0	0	0	0,056139475	0	0	0	0	0	0
<i>Janibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	30,80377531	0	0	0	0
<i>Ornithinimicrobium</i>	0	0	0	0	0	0	0,018713159	0	0	0	0	0	0
<i>Curtobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,087328073	0	0	0	0	0	0
<i>Leifsonia</i>	0	0	0	0	0	0	0,034307457	0	0	0	0	0	0
<i>Microbacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,046782896	0	0	0	0	0	0
<i>Acaricomes</i>	0	0	0	0	0	0	0,00623772	0	0	0	0	0	0
<i>Arthrobacter</i>	0,284371909	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Kocuria</i>	0	0	0	0	0	0	0,065496055	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	0,005298855	0,756528826	0	0	0	0	0,215201322	0	0	0	0	0	0
<i>Nesterenkonia</i>	0,77539918	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rothia</i>	0	0	10,7246701	0	0	0	0,12163553	0	0,00943159	0	0	0	0
<i>Mycobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,12787325	0	0	0	0	0	0
<i>Gordonia</i>	0	0	0	0	0	0,187717887	0,654960546	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodococcus</i>	0,385050163	0,634279437	0	0	0	0	0,639366248	0	0	0	0	0	0
<i>Marmoricola</i>	0	0	0	0	0	0	0,12163553	0	0	0	0	0	0
<i>Nocardioides</i>	0	0	0	0	0	0,26816841	0,037426317	0	0	0	0	0	0
<i>Friedmanniella</i>	0	0	0	0	0	0	0,00623772	0	0	0	0	0	0
<i>Propionibacterium</i>	0,005298855	0	0	0	0	0	0,015594299	0	0	0	0	0	0
<i>Sanguibacter</i>	0	0	0	0	0	0,514883347	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,037426317	0	0,301810865	0,533689126	0	0	0
<i>Enterorhabdus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,018863179	0,172337114	0	0	0
<i>Olsenella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,138981543	0
<i>Parvibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,016677785	0

<i>Gaiella</i>	0	0	0	0	0	0,021832018	0	0	0	0
<i>Conexibacter</i>	0	0	0	0	0	0,059258335	0	0	0	0
<i>Bacteroides</i>	0,849583157	1,362460579	10,51218967	0,123357469	0	18,18389405	0,977741449	6,117967534		
<i>Barnesiella</i>	0	0	0	0	0	21,32168008	2,104180565			
<i>Copro bacter</i>	0	0	0	0	0	0,600477867	0,214031577			
<i>Parabacteroides</i>	14,35813198	9,834874739	0	0	0	0,355256539	10,91839004			
<i>Alloprevotella</i>	0	0,015945572	0	0	0,021832018	6,957369215	0,047253725			
<i>Prevotella</i>	1,441288682	0	0	0	0	0,132042254	0,050033356			
<i>Alistipes</i>	0	0	0	0	0	1,490191147	1,587169224			
<i>Dyadobacter</i>	0	0	0	0	0,077971494	0	0			
<i>Pontibacter</i>	0,874311149	0	0	0	0	0	0			
<i>Chryseobacterium</i>	0	0	0	0,15017431	0,018713159	0	0			
<i>Cloacibacterium</i>	0	0,171857836	0	0	0,093565792	0	0			
<i>Asinibacterium</i>	0	0,015945572	0	0,010726736	0	0	0			
<i>Flavisolibacter</i>	0,146601667	0	0	0	0	0	0			
<i>Sediminibacterium</i>	0	0	0	0	0,056139475	0	0			
<i>Segetibacter</i>	0,134237671	0	0	0	0	0	0			
<i>Pedobacter</i>	0	0	0	0	0,405451767	0	0			
<i>Sphingobacterium</i>	0	0	13,72176247	0	0,143467548	0	0			
<i>Litorilinea</i>	0	0	0	0	0,046782896	0	0			
<i>Ktedonobacter</i>	0	0	0	0	0,12163553	0	0			
<i>Mucispirillum</i>	0	0	0	0	0	0,449572435	0,614298421			
<i>Deinococcus</i>	0	0	0	0	0,062377195	0	0			
<i>Anoxybacillus</i>	0	0	0	0	0,109160091	0	0			
<i>Bacillus</i>	0	0	0	60,16626441	19,32445498	0	0			
<i>Geobacillus</i>	0	0	0	0	0,074852634	0	0			
<i>Pullulanibacillus</i>	0	0	0	0	0,053020616	0	0			
<i>s_Incertae_Sedi</i>	0	0	0	0	0,093565792	0	0			
<i>Brochothrix</i>	0	1,064809893	0	0	0	0	0			
<i>Paenibacillus</i>	0	0	0	0	0,102922372	0	0			
<i>Lysinibacillus</i>	0	0	0	0	0,36178773	0	0			
<i>Staphylococcus</i>	3,818708492	8,568087594	0	0,412979351	0,499017559	0	0			
<i>Dolosigranulum</i>	0	0	0	0	0,074852634	0	0			
<i>Granulicatella</i>	0	0	0	0	0,056139475	0	0			

<i>Enterococcus</i>	0,835452876	9,923461252	0	1,067310271	0,099803512	0	0	1,289748721
<i>Lactobacillus</i>	0,18192737	0	0	0	0,305648255	0	1,163229376	12,62786302
<i>Pediococcus</i>	0	0	0	0	0,17775006	0	0	0
<i>Lactococcus</i>	0	2,522943907	0	0	0,018713159	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	0	4,349597817	0	2,606596943	1,119670648	0	0,012575453	0
<i>Clostridium_sensu_stricto</i>	0	0	0	0	0,021832018	0	0	0
<i>s_Incertae_Sedis_Acetatifactor</i>	0	3,477906524	0	0,010726736	0,2401522	0	0,402414487	0,072270403
<i>Acetitomaculum</i>	0	0	0	0	0	0	0,279803823	0,025016678
<i>Anaerostipes</i>	0,005298855	0	0	0	0	0	1,232394366	0
<i>Blautia</i>	0,312632471	0	0	0	0,031188597	0	0	0
<i>Butyrivibrio</i>	0,164264519	0	0	0	0	0	0,13832998	0
<i>Clostridium_XIVa</i>	0,483962131	0	0	0	0	0	10,6639839	5,311874583
<i>Clostridium_XIVb</i>	0	0	0	0	0	0	0,044014085	0,169557483
<i>Coproccoccus</i>	0	0	0	0	0	0	0,022007042	0
<i>Dorea</i>	0	0	0	0	0,049901756	0	0,012575453	0,230709362
<i>Hungatella</i>	0	0	0	0	0	0	0,00943159	0
<i>Lachnoanaerobaculum</i>	0	0	0	0	0	0	0,006287726	0
<i>Marvinbryantia</i>	0	0	0	0	0	0	0,172912475	0
<i>Ruminococcus2</i>	0	0	0	0	0	0	0,028294769	0
<i>Stomatobaculum</i>	0	0	0	0	0	0	0,35256539	0
<i>Peptococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0,088028169	0
<i>Acetanaerobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,286091549	0
<i>Anaerotruncus</i>	0	0	0	0	0	0	0,465291751	1,587169224
<i>Butyricoccus</i>	0	0,244498778	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium_III</i>	0	0	0	0	0,018713159	0	0	0
<i>Clostridium_IV</i>	0	0	0	0	0	0	0,493586519	0,008338893
<i>Ethanoligenens</i>	0	0	0	0	0	0	0,00943159	0
<i>Faecalibacterium</i>	0	0,894723787	0	0	0	0	0	0
<i>Flavonifractor</i>	0	0	0	0	0	0	0,320674044	0,853346676
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,185487928	0,133422282
<i>Intestinimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0,572183099	2,53780298

Clostridia

<i>Achromobacter</i>	0,420375866	0	0	0	0,043664036	0	0	0
<i>Bordetella</i>	0	0	0	0	0,034307457	0	0	0
<i>Castellanella</i>	0	0	0	0	0,024950878	0	0	0
<i>Cupriavidus</i>	1,317648721	0	0	0	0	0	0	0
<i>s_incertae_sedis</i>	0	0	0	0,080450523	0,059258335	0	0	0
<i>Acidovorax</i>	0	1,137450835	0	0	0	0	0	0
<i>Comamonas</i>	0	0	0	0	0,071733774	0	0	0
<i>Curvibacter</i>	0,206655362	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diaphorobacter</i>	0	0	0	0	0,00623772	0	0	0
<i>Pelomonas</i>	0,030026848	0,744126714	2,874077388	0	0	0	0	0
<i>Schlegelella</i>	0	0	0	0	0,043664036	0	0	0
<i>Massilia</i>	0,021195422	0	0	0	0,037426317	0	0	0
<i>Parasutterella</i>	1,194008761	1,438644981	0	0	0	0,506161972	26,94018234	0
<i>Neisseria</i>	0,252578776	0	0	0	0	0	0	0
<i>Snodgrassella</i>	0	0	0	0	0	0	0,005559262	0
<i>Vogesella</i>	0	0	0	0	0,037426317	0	0	0
<i>Nitrosospira</i>	0	0	0	0	0,015594299	0	0	0
<i>Dechloromonas</i>	0,12363996	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sulfuritalea</i>	0	0,014173842	0	0	0	0	0	0
<i>Bdellovibrio</i>	0	0	0	0	0,012475439	0	0	0
<i>Vampirovibrio</i>	0,167797089	0	0	0	0	0,103747485	0	0
<i>Desulfovibrio</i>	0	0	0	0	0	2,386192153	0,122303758	0
<i>Kofleria</i>	0	0	0	0	0,028069738	0	0	0
<i>Phaselocystis</i>	0	0	0	0	0,056139475	0	0	0
<i>Byssovorax</i>	0	0	0	0	0,068614914	0	0	0
<i>Arcobacter</i>	0,005298855	0	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter</i>	0	0	0	0,402252615	0	0	0	0
<i>Aeromonas</i>	4,638264802	9,935863364	0	0	0,018713159	0	0	0
<i>Moritella</i>	0	0	0	0	0,00311886	0	0	0
<i>Shewanella</i>	0,23668221	0,582899259	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia/Shigella</i>	0	0,014173842	0	0,080450523	0,028069738	0,045669052	0,011118524	0
<i>Pseudocitrobacter</i>	0,001766285	0	0,033549542	0,037543577	0,049901756	0	0	0
<i>Serratia</i>	0	0	0	0	0,00623772	0	0	0
<i>Diploricettsia</i>	0	0	0	0	0,009356579	0	0	0

<i>Legionella</i>	0	0	0	0,160901046	0,024950878	0	0	0	0
<i>Halomonas</i>	0	0	0	0	0,018713159	0	0	0	0
<i>Haemophilus</i>	0	0,405726232	0	1,142397426	0,358668871	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0,623649056	0	2,676320729	1,09783863	24,90485614	0,015719316	0	0
<i>Enhydrobacter</i>	0	0	8,353835831	0,284258514	0,00623772	0	0	0	0
<i>Azorhizophilus</i>	0	0	0	0	0,015594299	0	0	0	0
<i>Azotobacter</i>	0	0	0	0,225261464	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	5,042744101	0,829169767	5,927085663	23,26092786	54,83579203	0,022834526	0	0	0
<i>Povallibacter</i>	0	0	0	0	0,015594299	0	0	0	0
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0	0	0	0	0,028069738	0	0	0	0
<i>Stenotrophomonas</i>	0,468065565	0,005315191	0	0	0,00623772	0	0	0	0
<i>Thermomonas</i>	0	0	0	0	0,180893865	0	0	0	0
<i>Vulcaniibacterium</i>	0	0	0	0	0,015594299	0	0	0	0
<i>Xanthomonas</i>	0	0	0	0,477339769	0,439759224	0	0	0	0
<i>Anaeroplasma</i>	0	0	0	0	0	0	0,025150905	0	0
Mollicutes									

Tabla A2. Abundancia relativa de los distintos géneros bacterianos detectados al secuenciar el gen 16S rRNA en los experimentos de conjugación con microbiota fecal humana como población aceptora. Se representa la abundancia relativa de cada género bacteriano y la clase a la que pertenece dicho género. El orden en que se muestran los diferentes géneros detectados (filas) coincide con el de la figura R21. Las columnas indican los plásmidos conjugativos utilizados con distintas combinaciones de plásmido (R388 o RP4) y promotor (Ptet o Plac) así como la muestra de heces utilizada como población aceptora (cultivada (C) o no cultivada (NC)). **(A)** Géneros obtenidos a partir de las muestras secuenciadas en el Experimento 1. **(B)** Géneros obtenidos a partir de las muestras secuenciadas en el Experimento 2.

A. Experimento 1

Taxonomía	Transconjugantes										Aceptores			
	Clase	Género	NC			C			NC			C		
			Ptet	R388	RP4	Ptet	R388	RP4	Plac	R388	RP4			
		<i>Georgenia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Cellulomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Blastococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Aquipuribacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Arsenicicoccus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Curtobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Arthrobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Kocuria</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Nesterenkonia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Rhodococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Marmoricola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Nocardioides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Friedmanniella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Sanguibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Bifidobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23,21826409	0,28315738	0
		<i>Atopobium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Gordonibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,041342245	0,017478851	0
		<i>Conexibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Patulibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Bacteroides</i>	0,00141002	0,16215519	0	0	0	0	0	0,100995262	10,2069409	6,100118856	0	0
		<i>Barnesiella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,073497324	0	0	0
		<i>Butyrificimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,098762029	0,370551633	0	0
		<i>Coproobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,08268449	0	0	0
		<i>Odoribacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,245756678	0,013983081	0	0
		<i>Parabacteroides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,195227268	1,48919807	0	0
		<i>Paraprevotella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1332139	0,041949241	0	0
		<i>Alistipes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4,7176095	0,101377333	0	0
		<i>Hymenobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Sphingobacteria	<i>Asinibacterium</i>	0	0	0	0,229003057	0,398359581	0	0	0
	<i>Vibrionimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Thermomicrobia	<i>Nitrolancea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Anoxybacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Salinicoccus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	1,17379054	0	0	0	0
	<i>Carnobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,036748662	0
	<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacilli	<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Lactococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,017478851
	<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0	0	0	2,645903673	0,793539817
	<i>Christensenella</i>	0	0	0	0	0	0	0,025264705	0,038453471
	<i>Clostridium_sensu_stricto</i>	0	0	0	0	0	0	0,174556145	0
	<i>s_Incertae_Sedi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Defluviitalea</i>	0	0	0	0	0	0	0,034451871	0
	<i>Anaerostipes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Blautia</i>	0	0	0	0	0	0	0,204414433	0
	<i>Butyrivibrio</i>	0	0,60623929	0	0	0	0	1,171363605	0,188771586
Clostridia	<i>Clostridium_XIVa</i>	0,154397146	0	0,524842547	1,648582219	3,11346886	2,365125418	2,096970532	49,15052786
	<i>Clostridium_XIVb</i>	3,4820434	0	0	0	0	0	0,013780748	0
	<i>Coproccoccus</i>	0	0	0	0	0	0	0,500700521	0
	<i>Dorea</i>	0,225603136	1,220770606	0	0,599484443	0	0,235961659	0,186040102	0,639725932
	<i>Eisenbergiella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,034957701
	<i>Hespellia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,206250437
	<i>Hungatella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,125847724
	<i>Lachnospira</i>	0	0	0	0	0	0	0,006890374	0
	<i>Lactonifactor</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,069915402
	<i>Roseburia</i>	0	0	0	0	0	0	1,701922414	0
	<i>Ruminococcus2</i>	0	0	0	0	0	0	0,633914422	0
	<i>Peptococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0,045935828	0,041949241
	<i>Peptoniphilus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium_XI</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Romboutsia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,227382347	

<i>Acetanaerobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,022967914	0
<i>Anaerofilum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,167796966
<i>Anaerotruncus</i>	0	0	0	0	0	0	0,020671122	0
<i>Butyricoccus</i>	0	0	0	0	0	0	0,202117642	0
<i>Clostridium_IV</i>	0	0	0	0	0	0	0,429499989	0,108368874
<i>Faecalibacterium</i>	0	2,013119829	0	0	0	0	24,31613037	0,213241977
<i>Flavonifractor</i>	0,133951862	0	0	0	2,813965097	0	0,124026735	2,688247221
<i>Gemmiger</i>	0	0	0	0	0	0	6,348331381	0,090890023
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,048232619	0
<i>Intestinimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0,034451871	0,223729288
<i>Oscillibacter</i>	0	0	1,708960996	0	4,892873572	0,522420948	0,659179127	2,775641474
<i>Pseudoflavonifractor</i>	0	0	0,236639535	0	0	0	0,064310159	0,174788506
<i>Ruminococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0,144697857	0
<i>Sporobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0,075794116	0
<i>Clostridium_XVIII</i>	0	0	0	0	0	0	1,64450263	0
<i>Holdemanina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,059428092
<i>Phascolarctobacterium</i>	0	0	0	0	3,305307872	0	3,814970486	1,587079634
<i>Anaeroglobus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,083898483
<i>Megasphaera</i>	0	0	0	0	0	0,437034045	0	0,104873104
<i>Veillonella</i>	0	0	0	0	0	0	0,064310159	0,150318115
<i>Fusobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,013983081
<i>Leptotrichia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,00699154
<i>Brevundimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,01048731
<i>Caulobacter</i>	0,164267283	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phenyllobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aurantimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bosea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bradyrhizobium</i>	0	0	0	0	0	0,076205516	0	0,031461931
<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0,004593583	0
<i>Phyllobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodoligotrophos</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Amaricoccus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paracoccus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Kushneria</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Haemophilus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,121729943	0,034957701	0	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,011017665	0,075794116	0	0	0
<i>Povallibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Akkermansia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,034451871	0	0	0
Verrucomicrobiae												

B. Experimento 2

Taxonomía	Transconjugantes						Aceptores								
	NC			C			NC			C					
	Ptet	R388	RP4	Plac	R388	RP4	Ptet	R388	RP4	Plac	R388	RP4	Ptet	R388	RP4
Clase	Género														
	<i>Georgenia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Cellulomonas</i>	0	0	0	0,729423927	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	0	2,667468913	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Blastococcus</i>	0	0	0	0,706449945	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Aquipuribacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Arsenicicoccus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Curtobacterium</i>	0	0	0	4,640744357	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Arthrobacter</i>	0	0	0	0	25,17047734	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Kocuria</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Nesterenkonion</i>	0	0	0	0,338866234	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Rhodococcus</i>	0	0	0	0,304405261	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Marmoricola</i>	0	0	0	1,596691747	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Nocardioides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Friedmanniella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Sanguibacter</i>	0	0	0	0,137843892	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Bifidobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,201768601	0,271414613
	<i>Atopobium</i>	0	0	0	0,557119063	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Gordomibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Conexibacter</i>	0	0	0	0,143587387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Patulibacter</i>	0	0	0	4,491413474	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Bacteroides</i>	1,604588688	0	0	0	32,75170477	0	0	0	0	0	0	0	1,533368183	3,779284957
	<i>Barnesiella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Butyricimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,058019727	1,053088698
	<i>Coprobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,028009523	0
	<i>Odoribacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,092031291	0
	<i>Parabacteroides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,365917407	0,08602925
	<i>Paraprevotella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,21713169
	<i>Alistipes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,621571334	0,249701444
	<i>Hymenobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,34169716	0

<i>Haemophilus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,056019047	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	18,7295388	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Povailibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,296218854	0	0
<i>Xanthomonas</i>	0	0	22,40537591	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Akkermansia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,276093872	0
Verrucomicrobiae											

