



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Propagación de la resistencia a los antibióticos en poblaciones bacterianas: modelos de propagación y estrategias de respuesta.

Antibiotic resistance propagation in bacterial populations: propagation models and response strategies.

Autor: D. Jorge Moliner Malaxechevarría

**Director/es: Dr. Fernando de la Cruz Calahorra
Dr. Raúl Fernández López**

Santander, Junio 2018

Agradecimientos

Quiero agradecer su ayuda todos los miembros del equipo de intergenómica del IBBTEC. En especial al Dr. Fernando de la Cruz por posibilitarme hacer éste trabajo y al Dr. Raúl Fernández por su gran ayuda y guía a través de un campo que prácticamente desconocía, sin él hubiera sido imposible realizar este proyecto.

A mi familia por su apoyo incondicional y a mi hermano por sus consejos matemáticos e informáticos.

Resumen

La resistencia a antibióticos es uno de los grandes problemas de la medicina moderna y se espera que aumente en los próximos años. La mayoría de estos mecanismos de resistencia son codificados y transmitidos por plásmidos bacterianos, con lo que su propagación entre bacterias de la misma o de distinta especie es muy rápida. Actualmente han aparecido distintas líneas de investigación que intentan actuar sobre estos plásmidos para disminuir la resistencia a antibióticos: inhibición de la conjugación, imitar la incompatibilidad, o el uso de Crispr-Cas. En el presente trabajo hemos modelizado matemáticamente estas estrategias para comparar cuales son más efectivas y prever los resultados de su uso. Para ello hemos comparado los modelos de transmisión basados en FDT y DDT con datos experimentales y finalmente hemos utilizado un sistema basado en FDT para producir nuestras estimaciones.

Palabras clave: Resistencia a antibióticos, modelos de transmisión, plásmidos, biología de sistemas.

Abstract

Antibiotic resistance is one of the main problems of modern medicine, and it is expected to keep growing. Most of the mechanisms involved are encoded in transmissible plasmids. This fosters the spread of resistances among bacterial populations. Nowadays there are different investigation lines trying to fight resistance at the plasmid level including conjugation inhibition, incompatibility mimicking or using Crispr-Cas. In this study we have developed a mathematical model of this strategies in order to compare their effectiveness and to anticipate their results. We have compared the transmission models based on FDT and DDT with empirical data which led to the use of an FDT model. Finally we have developed our estimations based on this system.

Keywords: Antibiotic resistance, transmission dynamics, plasmids, systems biology.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	III
Abstract	V
1. Introducción	1
1.1. ¿Qué es la resistencia a antibióticos?	2
1.2. Mecanismos de Resistencia a Antibióticos	3
1.3. Transmisión genética horizontal	4
1.4. Conjugación bacteriana	5
1.4.1. Plásmidos	6
1.4.2. Mecanismo de la conjugación	6
1.5. Barreras a la transmisión genética horizontal	7
1.5.1. Restricción modificación	7
1.5.2. Exclusión de superficie	8
1.5.3. Crispr-Cas	8
1.6. Inhibición de la acción de los plásmidos	9
1.6.1. Inhibición de la conjugación	9
1.6.2. Imitar la incompatibilidad entre plásmidos	9
1.6.3. Bloqueo del sistema toxina-antitoxina	10
2. Objetivos	11
3. Modelos de transmisión de plásmidos bacterianos	13
3.1. Transmisión Dependiente de Densidad	14
3.1.1. Progreso del plásmido en el modelo DDT	15
3.2. Transmisión Dependiente de Frecuencia	16
3.2.1. Progreso del plásmido en FDT	17
3.2.2. Forma explícita de FDT	18

3.3. DDT o FDT	18
4. Modelización de las estrategias de inhibición de la transferencia	21
4.1. Imitar la incompatibilidad entre plásmidos	21
4.1.1. ¿Puede haber fijación completa?	22
4.1.2. ¿Puede haber eliminación completa?	23
4.2. Inhibición de la Conjugación	23
4.3. Resistencia a la conjugación	24
5. Discusión	27
Bibliografía	29

Introducción

En 1928 Fleming descubrió la penicilina y su acción bactericida, pero también observó que a algunas bacterias no las afectaba, entre ellas *E.Coli* [1]. Años más tarde de este descubrimiento, Abraham y Chain averiguaron que la razón por la que *E.Coli* era resistente a la penicilina estaba en una enzima capaz de degradar ésta [2]; enzimas que hoy en día se denominan β -lactamasas. A partir de entonces la carrera por descubrir nuevos antibióticos ha tenido que afrontar el aumento de resistencias a ellos.

En el momento de introducirse la penicilina la mayoría de las cepas de *S. aureus* eran sensibles, en la actualidad lo son menos del 5-10%. En los años ochenta, al introducir la cefotaxima, *E. coli* y *K. pneumoniae* eran sensibles, mientras que ahora un 13% y 16% (respectivamente) de las cepas que aparecen en hemocultivos en España son resistentes.[3]

El problema se agrava si tenemos en cuenta que cada vez se invierte menos en el desarrollo de nuevos antibióticos. De las dieciocho compañías que investigaban nuevos antibióticos en 1990 hemos pasado a sólo 4 en 2010.[4] Entre la introducción del ácido nalidixico en 1962 y el linezolid en 2000 pasaron 37 años en los que no aparecieron nuevos grupos de antibióticos, solo modificaciones de los existentes. [5].

Hoy en día la importancia de los antibióticos va mucho más allá del tratamiento de infecciones, son necesarios para la profilaxis en prácticamente cualquier intervención quirúrgica, en la prevención de brotes de meningitis, y han posibilitado el uso de fármacos inmunosupresores para tratar determinadas enfermedades. Un mundo post-antibióticos nos dejaría sin parte de los mayores avances de la medicina moderna, sin trasplantes, ni válvulas cardíacas, ni trasplantes de progenitores hematopoyéticos, ni prácticamente ningún tratamiento en reumatología, etc. [3]

La lucha contra la resistencia a antibióticos implica por una parte evitar y disminuir la resistencia a los antibióticos ya conocidos y por otra desarrollar nuevos compuestos que no generen resistencias o que disminuyan las resistencias a otros antibióticos.[5, 6] Es precisamente en ésta última estrategia en la que se va a centrar este trabajo. Vamos a revisar las posibles vías por las que podemos disminuir la transferencia de resistencias a antibióticos entre bacterias, y usar modelos matemáticos para pronosticar cuales serán más útiles.

1.1. ¿Qué es la resistencia a antibióticos?

La resistencia a los antibióticos es un mecanismo de supervivencia bacteriano mucho más antiguo que el uso de éstos por el ser humano. Desde hace miles de años la lucha por la supervivencia entre bacterias y hongos ha producido mecanismos de ataque, los antibióticos, pero también de defensa frente a ellos. Una primera definición de resistencia podría ser la capacidad de *sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie*. [3]. Esta definición es muy simple, pero tiene un problema, una cepa bacteriana puede sobrevivir en una concentración determinada de antibiótico, pero no en las concentraciones que se encuentran en un paciente. De ese modo estaríamos diciendo que una bacteria es resistente, a pesar de poder ser tratada. En la práctica clínica se suele aceptar que una bacteria es resistente cuando no es posible alcanzar una concentración in vivo (en el paciente) suficiente para inhibir su crecimiento, y si ésta concentración sí se puede adquirir hablaremos de bacterias sensibles. Esta definición tiene algunos problemas; como definir la concentración máxima de medicamento que puede llegar al lugar de la infección, aparte de que no es universal pues implica que un mismo patógeno puede ser resistente o sensible dependiendo de que infección produzca[7]; aun así suele usarse por su utilidad clínica, y por tanto es la que vamos a seguir en nuestro estudio. En cualquier caso, como vamos a analizar la transmisión de la resistencia, no nos importa tanto el punto de corte cómo la transmisibilidad, y ésta será siempre la misma mientras esté codificada en los mismos elementos genéticos.

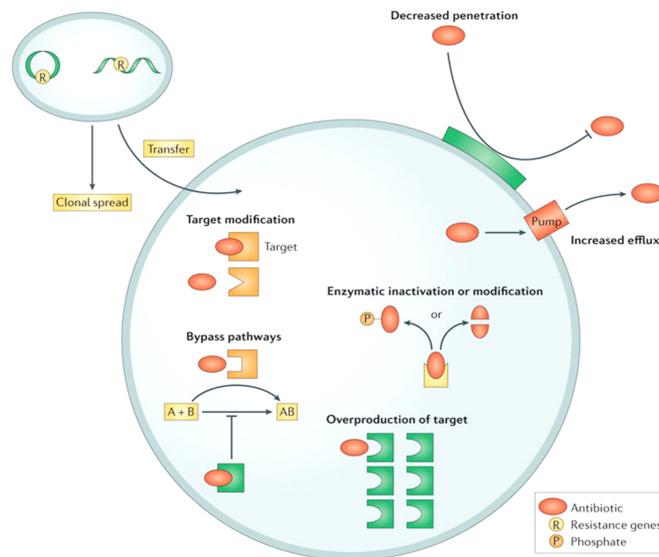


Figura 1.1. Resumen de los mecanismos de Resistencia a Antibióticos. Tomado de Coates *et al.* 2002

1.2. Mecanismos de Resistencia a Antibióticos

En la figura 1.1 se muestran las principales vías por las que una bacteria puede conseguir resistencia ante un antibiótico: disminuir la entrada de antibiótico, aumentar el flujo de expulsión, modificar el blanco de acción, inactivación enzimática, sobreproducción del blanco de acción o uso de vías alternativas.

1. **Inactivación enzimática:** una razón por la que el fármaco puede no llegar a la diana es que la bacteria produzca una sustancia que lo degrade. Cómo ya hemos discutido éste es el mecanismo de acción de las betalactamasas observado por Abraham y Chain en 1940 [2].
2. **Disminución de la entrada:** recientemente se han descrito cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina. La principal característica que presentan es un engrosamiento de la pared celular, que disminuye la capacidad de penetración de los glucopéptidos cómo la vancomicina. [8]

3. **Aumentar el flujo de expulsión:** lo cual se consigue principalmente con las *bombas de expulsión*, con las que consiguen que el medicamento no alcance concentraciones suficientemente elevadas dentro del citoplasma. Un ejemplo de este sistema es la bomba AcrAB presente en *K. pneumoniae* produciendo cepas multirresistentes [9].
4. **Modificación del sitio de acción** cabe destacar a los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM). Estos cocos adquieren la resistencia a penicilinas gracias al gen *mecA*, que codifica una versión distinta de la proteína de unión a penicilinas (PBP), conocida como PBP2a [10]. Al mutar la proteína sobre la que actúa el antibiótico, éste deja de hacer efecto.
5. **Sobreproducción del blanco de acción:** el caso del Trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/SMX) es el ejemplo mas claro de este mecanismo. Las cepas de *Escherichia coli* resistentes son capaces de producir cien veces más cantidad de dihidrofolato reductasa que las sensibles. Al ser ésta la enzima sobre la que actúa el TMP/SMX este exceso de diana hace que el antibiótico pierda su eficacia [11].

1.3. Transmisión genética horizontal

Ya hemos comentado que la resistencia a antibióticos lleva existiendo desde antes del uso de éstos. Sin embargo la proporción de bacterias resistentes ha aumentado enormemente por su uso. Comprender la razón de ésta expansión es un paso fundamental para poder afrontar el problema. Ya sea por la producción de ciertas proteínas, o por alteración en su estructura, la resistencia a antibióticos viene codificada en los genes. Estos genes pueden aparecer bien por mutaciones o bien por transferencia horizontal desde otras especies [12, 13]

Una vez han aparecido, estos genes pueden transmitirse a la descendencia, por replicación clonal, o entre bacterias, por transferencia horizontal[14]. La replicación clonal junto a la selección natural van a explicar por qué el uso de antibióticos produce un aumento en la resistencia. Supongamos que ciertos individuos de una población tienen mecanismos de resistencia a antibióticos, si introducimos un antibiótico el resto de elementos perderán la capacidad de reproducirse o di-

rectamente morirán. A partir de ése momento las bacterias resistentes pueden replicarse sin competencia y pasan a ser predominantes [15]. La importancia de ésto queda reflejada en el estudio realizado por Goosens et al. que demostró cómo los países de Europa con mayor consumo de antibióticos son a su vez los que mayores tasas de resistencias presentan[16].

Por otra parte la transferencia horizontal es un conjunto de mecanismos por los cuales una bacteria es capaz de incorporar información genética proveniente de otras, no necesariamente de su misma especie. Hay tres grandes mecanismos por los que ésto puede ocurrir: transformación, conjugación y transducción. La transformación es la capacidad de una bacteria de incorporar material genético libre presente en el medio a su propio genoma. En el caso de la transducción es un virus bacteriófago el que introduce el ADN proveniente de otra célula en la bacteria. Finalmente la conjugación es el paso de ADN de una bacteria a otra a través de una unión física [14]. La transferencia horizontal puede producir la ganancia de genes útiles para la supervivencia en el medio. También pueden ser genes que produzcan un coste a la bacteria, ésto dependerá del ADN en cuestión, del ambiente y del estado previo de la bacteria [17]

1.4. Conjugación bacteriana

La conjugación bacteriana es una forma de transmisión genética entre dos bacterias que se unen temporalmente por un complejo molecular. Las moléculas de ADN que se transmiten son principalmente los plásmidos y los ICE (elementos conjugativos e integrativos)[18]. Una característica común de ambos tipos de moléculas es que deben contener una secuencia denominada origen de la transferencia (*oriT*), la cual es necesaria para comenzar la conjugación, y un mecanismo para la transferencia del ADN hacia la otra bacteria[14, 19]. La importancia tanto de los plásmidos como de los ICEs radica en que en muchas ocasiones contienen genes de resistencia a antibióticos [18]. Las denominadas islas de patogenicidad son conjuntos de genes que producen un aumento en la patogenicidad de la bacteria o en su resistencia al medio o antibióticos que suelen encontrarse en éstos elementos [20]. Un ejemplo que muestra la relevancia médica de este hecho es el plásmido pLW1043, el primer vector conocido de resistencia a Vancomicina en *S. aureus*[21].

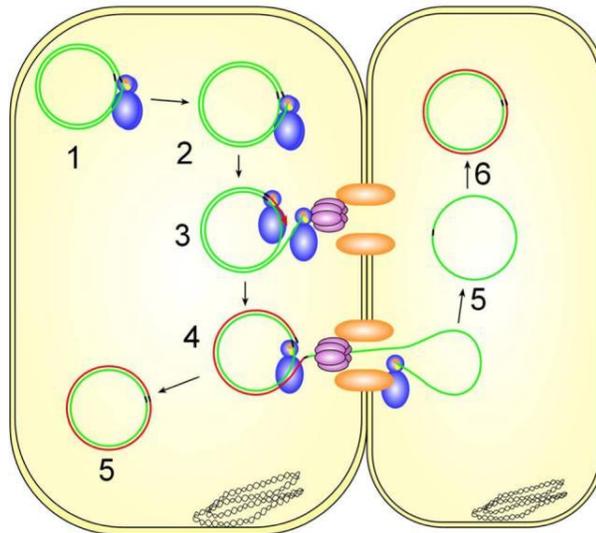


Figura 1.2. Modelo del mecanismo conjugación bacteriana

1.4.1. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN extracromosómico con la capacidad de autorreplicarse independientemente de los cromosomas bacterianos [20]. Los denominados plásmidos conjugativos contienen la información necesaria para su propia transmisión, sin embargo también existen plásmidos mobilizables, que no son capaces de realizar la conjugación por sí mismos pero pueden utilizar los mecanismos de otros plásmidos conjugativos que cohabitan en la bacteria [18].

Dentro de la bacteria los plásmidos son capaces de transcribir sus productos sin necesidad de integrarse en el cromosoma bacteriano. Sin embargo puede haber intercambio de genes entre el plásmido y el cromosoma por recombinación [14].

1.4.2. Mecanismo de la conjugación

El primer requisito es un contacto físico entre dos bacterias, esto se realiza generalmente por un pili, que produce un *poro de unión* a través del cual ambos citoplasmas se relacionan. En bacterias Gram negativas el paso del plásmido se produce por un sistema de secreción tipo IV. Por el contrario, en Gram positivas es un conjunto muy heterogéneo de mecanismos con algunas características especiales. Una

1.5. BARRERAS A LA TRANSMISIÓN GENÉTICA HORIZONTAL

de éstas características es el uso de *feromonas* para inducir la formación de los complejos de unión entre donante y receptor del plásmido. Los plásmidos suelen inhibir la proteína de unión a las feromonas impidiendo que las bacterias en las que están presentes sean invadidas por otros plásmidos. Además, cada uno de los diversos mecanismos parece producir una feromona distinta, de manera que la conjugación sólo es posible entre determinados grupos de bacterias. Sin embargo algunas feromonas de distintas especies están relacionadas morfológicamente entre sí, permitiendo la conjugación entre, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* y enterococos, lo que podría favorecer la transferencia de resistencia a antibióticos [14]. De hecho está documentada esta transferencia a Vancomicina mediada por plásmido desde VRE a MRSA [6, 21].

El siguiente paso es producido por la relaxasa, que se une a la región oriT, corta y separa ambas hebras del ADN del plásmido. La hebra 5'-3' comienza a separarse unida a la relaxasa y a otras proteínas (al conjunto se le denomina relaxosoma) y se une al canal transportador mientras que la otra hebra sirve de molde para que se vaya produciendo una segunda hebra 5'-3' en medio del proceso. De esta manera al acabar la conjugación el plásmido de la célula donante vuelve a tener doble cadena de ADN. El complejo de proteínas que forman el canal se denominada T4SS, y la unión del relaxosoma a ella es producida por T4CP. Una vez terminada la transferencia, la relaxasa vuelve a jugar un papel importante al inducir la unión de los dos extremos del plásmido produciendo de nuevo una molécula circular en el receptor [18].

1.5. Barreras a la transmisión genética horizontal

1.5.1. Restricción modificación

Las endonucleasas de restricción forman un sistema de defensa de las bacterias ante el ADN exógeno que no comparte las secuencias propias de ese género bacteriano. Es un sistema útil contra el ADN claramente diferente de el de la propia bacteria, aunque no tanto contra los plásmidos. Al tener un pequeño tamaño es poco probable que los plásmidos contengan alguna secuencia complementaria de las enzimas de restricción, y además parece que el hecho de entrar como una

cadena simple les confiere mayor protección que a ácidos nucleicos de doble cadena. Aun así, sí está demostrado que la frecuencia de conjugación disminuye si el plásmido tiene secuencias complementarias de las endonucleasas. Algunos plásmidos contienen genes como *ardA* o similares que interfieren con las endonucleasas, pudiendo invadir más fácilmente cepas con sistemas de restricción. [14]

Finalmente, en ocasiones es el propio plásmido el que lleva sistemas de restricción-modificación, con lo que la bacteria infectada consigue el sistema para protegerse de nuevos plásmidos. [14].

1.5.2. Exclusión de superficie

Este sistema está codificado en los plásmidos conjugativos, y previene principalmente frente a la conjugación con otros plásmidos de la misma familia. La exclusión de superficie es un conjunto de cambios que ocurren en la membrana celular para disminuir la posibilidad de conjugación. Sin embargo la exclusión no protege a la bacteria completamente. Cada familia de plásmidos tiene su propio sistema de exclusión de superficie, con lo que generalmente no pueden convivir dos plásmidos de la misma familia [14].

1.5.3. Crispr-Cas

CRISPR-Cas es un sistema muy extendido en procariontes que degrada específicamente ADN exógeno. Actualmente se conocen al menos tres sistemas diferentes, por lo que vamos a explicar las características comunes. La primera característica del sistema es la presencia de un locus cromosómico denominado CRISPR que contiene una serie de repeticiones palindrómicas y de espaciadores (el nombre proviene del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Los espaciadores contienen cadenas de ADN de fagos o de elementos conjugativos, con el objetivo de servir de molde para crear cadenas de ARN complementarias a ellos. La otra parte del sistema son las proteínas Cas (*CRISPR associated*) que utilizan los fragmentos de ARN transcrito por el locus CRISPR para reconocer las secuencias exógenas y degradarlas. Se suele comparar el sistema de restricción-modificación con la respuesta inmune innata, y al CRISPR-Cas con la respuesta adquirida, pues el primero se dirige hacia secuencias universales mientras que CRISPR-Cas se dirige a secuencias específicas, y

necesita que la bacteria o alguno de sus progenitores haya tenido contacto con esa secuencia y la haya incorporado al locus CRISPR [17].

1.6. Inhibición de la acción de los plásmidos

Tres son las principales estrategias que se están explorando de cara a disminuir la resistencia a antibióticos mediada por plásmidos: Inhibición de la conjugación, imitar la incompatibilidad entre plásmidos, y bloqueo del mecanismo toxina-antitoxina [6].

1.6.1. Inhibición de la conjugación

El primero de los mecanismos propuestos será impedir la conjugación bacteriana. Ésto no afectaría a las bacterias que tienen el plásmido, pero disminuiría la propagación. Los primeros compuestos que se vio que podían inhibirla eran el ácido linoleico y el DHCA. Más adelante se propuso el uso de anticuerpos monoclonales contra la relaxasa, éstos compuestos han demostrado ser capaces de inhibir la conjugación en laboratorio, pero no han sido probados en humanos. Los principales problemas que tienen son dos: la administración de moléculas grandes suele requerir una vía parenteral y los efectos secundarios esperables (el uso de anticuerpos en la clínica produce muchos). Finalmente hay estudios que demuestran que ciertos bifosfonatos pueden inhibir la conjugación, de los vistos, dos de ellos están aprobados clínicamente: clodronato y etidronato. En cualquier caso aún está por demostrar que éstas estrategias sean útiles a la hora de disminuir la resistencia a antibióticos [6].

1.6.2. Imitar la incompatibilidad entre plásmidos

La incompatibilidad es la incapacidad de dos plásmidos de la misma familia de convivir en el mismo hospedador [6].

El mecanismo de incompatibilidad ha sido estudiado revelando un punto clave: SLI, que está implicado en la replicación del plásmido. Tras lo cual se han buscado compuestos como la apramycina capaces de unirse a la molécula SLI. El estudio demostró que tras 250 generaciones el plásmido se había eliminado casi por completo. Es por lo

tanto una vía interesante, aunque aún hay que conseguir compuestos que actúen más rápido y conocer en que plásmidos sería útil cada compuesto[6].

1.6.3. Bloqueo del sistema toxina-antitoxina

El sistema toxina antitoxina es un método de defensa de los plásmidos que consiste en una toxina estable y una antitoxina con vida media corta. Siempre y cuando la antitoxina esté presente, la toxina no actúa. Si en algún momento desaparece el plásmido con él desaparece la producción de antitoxinas, y al tener éstas una vida media mucho menor que las toxinas, la célula sufre la acción de las últimas y muere. De esta manera, una vez un plásmido entra en una célula y empieza a transcribir proteínas, la bacteria no puede perder el plásmido, pues implicaría la destrucción. También es un sistema importante para impedir que el plásmido se pierda por una segregación incorrecta en la división celular: si una célula hija no tiene el plásmido, sería inviable. El efecto que tendrían las sustancias que bloqueen este sistema sería por lo tanto bactericida[6].

Objetivos

El desarrollo de fármacos que inhiban la resistencia a antibióticos está todavía en fase de desarrollo y hay muchas líneas de investigación abiertas. Vamos a estudiar cuales de las posibles vías que se estudian podrían tener mayor utilidad en la práctica clínica.

Nuestro objetivo es **modelizar y comparar las estrategias farmacológicas que buscan inhibir la acción de los plásmidos**, haciendo las adaptaciones necesarias en los modelos de transmisión. En concreto vamos a estudiar que ocurre cuando:

- Se inhibe la conjugación.
- Aumentan las pérdidas del plásmido durante la conjugación.
- Introducimos una cepa inmune a la infección del plásmido.

Modelos de transmisión de plásmidos bacterianos

Se pueden adaptar los modelos clásicos de transmisión de infecciones a las bacterias considerando a los plásmidos como parásitos intracelulares. Para ello vamos a empezar suponiendo una población de N bacterias en la que algunos elementos (I) están infectados por un plásmido, mientras que otros no lo están (S). Inicialmente vamos a considerar que los individuos pueden pasar de no tener el plásmido (S) a tenerlo (I), pero que no existe la posibilidad de perder el plásmido.

La cantidad de bacterias que se infecten dependerá de la cantidad de ellas que aún no tienen el plásmido, de la tasa de contactos c , de la probabilidad de que el contacto sea con otra bacteria que sí tiene el plásmido i y de la probabilidad de que ése contacto dé lugar a una conjugación efectiva v . [22] Si consideramos solo las bacterias que se infectan nos quedaría por tanto la siguiente ecuación (más adelante consideraremos también la reproducción bacteriana):

$$\frac{dI}{dt} = Sciv \quad (3.1)$$

Generalmente se acepta que la tasa de contactos puede o bien ser constante, o bien depender de la densidad de individuos en un hábitat[22]; por ejemplo en las enfermedades de transmisión sexual podemos suponer que los individuos tienen una tasa de encuentros sexuales fija, independiente de la cantidad de infectados, en cambio en las enfermedades de transmisión aérea la tasa de encuentros depende de cuantos individuos vivan en el área. A continuación vamos a discutir que ocurre aplicando cada una de éstas posibilidades a la conjugación bacteriana.

3.1. Transmisión Dependiente de Densidad

Si suponemos que la tasa de contactos depende de la densidad poblacional N/A (siendo N el número total de bacterias y A el área del hábitat) tendremos una Transmisión Dependiente de Densidad (DDT, por sus siglas en inglés). Asumiremos entonces que $c = \kappa N/A$ siendo κ una constante. Por otra parte, podemos suponer que la probabilidad de que, en caso de ocurrir un contacto, éste sea con un individuo infectado es la frecuencia de bacterias con plásmidos: $i = I/N$.

$$\frac{dI}{dt} = S\kappa \frac{N}{A} \frac{I}{N} v \quad (3.2)$$

Suponiendo que κ y v son constantes, y que el área A del hábitat no varía (pues el área sería un ser humano, un catéter...) podemos agrupar $\kappa v/A = \beta_1$, a lo que llamamos coeficiente de transmisión.[22] Haciendo eso y simplificando nos queda:

$$\frac{dI}{dt} = \beta_1 SI \quad (3.3)$$

Finalmente, a esta ecuación podemos añadirle la variación en el número de infectados debidos a la propia división celular, que será $\alpha_1 I$:

$$\frac{dI}{dt} = \alpha_1 I + \beta_1 SI \quad (3.4)$$

Análogamente podemos describir la variación en el número de bacterias que no tienen el plásmido cómo:

$$\frac{dS}{dt} = \alpha_2 S - \beta_1 SI \quad (3.5)$$

Es decir, una parte ($\alpha_2 S$) debida a la demografía bacteriana menos la cantidad de bacterias que pasan a tener el plásmido. Aunque hay una gran variedad de plásmidos, en este trabajo solo vamos a considerar los que confieren resistencia a antibióticos. Tener un plásmido supone siempre un gasto de energía (generalmente llamado *fitness cost*). En ausencia de antibiótico, un plásmido que codifique resistencia no va a producir ninguna ventaja, solo un coste. Por ello diremos que la velocidad de división de las bacterias sin plásmido es mayor a las que si lo tienen: $\alpha_2 > \alpha_1$, y en concreto si la carga de tener el plásmido la definimos cómo b : $\alpha_2 = \alpha$ y $\alpha_1 = \alpha - b$. Quedando:

$$\begin{cases} \frac{dI}{dt} = (\alpha - b)I + \beta_1 SI \\ \frac{dS}{dt} = \alpha S - \beta_1 SI \end{cases} \quad (3.6)$$

3.1.1. Progreso del plásmido en el modelo DDT

Tal y cómo hemos planteado este modelo es evidente que la población de bacterias con plásmido va a crecer siempre. Lo que nos interesa en cambio es ver si aumentan a más o menos velocidad que los que no tienen plásmido. Queremos por lo tanto saber en qué condiciones la relación $i=I/S$ crece, cuando decrece y cuando se mantiene estable. Esto equivale a estudiar en que condiciones $d(I/S)/dt$ es positiva, nula, o negativa. Usando la regla del cociente:

$$\frac{dI/S}{dt} = \frac{\frac{dI}{dt}S - I\frac{dS}{dt}}{S^2} \quad (3.7)$$

Sustituyendo por los valores de las derivadas de S e I en las ecuaciones 3.6 obtenemos:

$$\frac{dI/S}{dt} = \frac{[(\alpha - b)I + \beta_1 SI]S - (\alpha S - \beta_1 SI)I}{S^2} \quad (3.8)$$

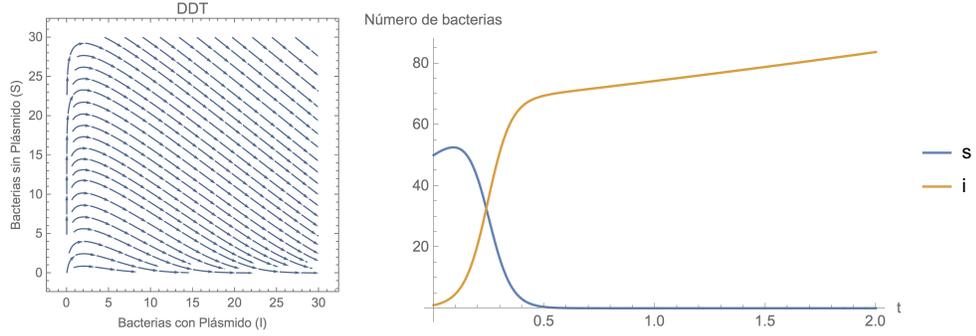
$$= \frac{(\alpha - b)I + \beta_1 SI - (\alpha - \beta_1 I)I}{S} \quad (3.9)$$

$$= \frac{I}{S}(\alpha - b + \beta_1 S - \alpha + \beta_1 I) \quad (3.10)$$

$$= \frac{I}{S}[-b + \beta_1(S + I)] \quad (3.11)$$

$$(3.12)$$

De esta última expresión podemos inferir que la derivada de la proporción de infectados será nula (la proporción entre infectados y susceptibles se mantendrá estable) solo si $I = 0$ o $b = \beta_1(S + I)$. Por otra parte, cómo I , b y β_1 no pueden ser negativas, la proporción solo descenderá si $b > \beta_1(S + I)$. Ahora bien, aunque la proporción disminuya, la cantidad total de bacterias aumentará, por lo tanto es posible que en algún momento se rebase el umbral $b = \beta_1(S + I)$. Tal y cómo está planteado el modelo no hay ninguna limitación al crecimiento, sin embargo en el mundo real las bacterias no crecen indefinidamente, sino que hay un máximo que pueden vivir en un medio (una densidad máxima). Por lo tanto el que prospere o no el plásmido va a depender de que alcancemos una densidad poblacional determinada. En la figura 3.1 hemos añadido una simulación del modelo DDT en el que se observa en que punto empieza a prosperar el plásmido.



(a) Campo vectores DDT

(b) Simulación DDT

Figura 3.1. Tanto en el campo de vectores (a) cómo en la simulación (b) se aprecia cómo inicialmente, si el número de bacterias con el plásmido es muy pequeño, aumentan la s bacterias sin plásmido, pero rápidamente las bacterias infectadas consiguen un crecimiento más rápido.

3.2. Transmisión Dependiente de Frecuencia

Partiendo de la ecuación 3.1 ($\frac{dI}{dt} = Sciv$) podemos formular otro modelo de transmisión si suponemos que la tasa de contactos es independiente de la densidad. Evidentemente ésta asunción falla si planteamos poblaciones poco concentradas, pero generalmente éste no es el caso de las bacterias, que pueden alcanzar concentraciones muy elevadas, incluso formando a veces biofilms. A este modelo lo denominamos Transmisión Dependiente de Frecuencia o FDT. Igual que en el modelo anterior, en caso de ocurrir un contacto la probabilidad de que sea con un individuo infectado es la frecuencia de bacterias con plásmidos: $i = I/N$:

$$\frac{dI}{dt} = Sc \frac{I}{N} v \quad (3.13)$$

Podemos agrupar c y v como $\beta = cv$:

$$\frac{dI}{dt} = S\beta_2 \frac{I}{N} \quad (3.14)$$

En la ecuación anterior es importante destacar que β tiene distintas unidades a β_1 , pues salen de agrupar términos distintos. De nuevo teniendo en cuenta el crecimiento obtenemos:

$$\frac{dI}{dt} = (\alpha - b)I + \beta S \frac{I}{N} \quad (3.15)$$

Mientras que la variación en el número de bacterias que no tienen el plásmido vendrá definida por:

$$\frac{dS}{dt} = \alpha S - \beta S \frac{I}{N} \quad (3.16)$$

3.2.1. Progreso del plásmido en FDT

A continuación vamos a obtener una ecuación que describa la progresión de un plásmido en una población siguiendo el modelo FDT. Para ello vamos a centrarnos en la proporción de células infectadas por el plásmido $i = I/N$. Podemos conocer la derivada de i respecto del tiempo usando la regla del cociente:

$$\frac{di}{dt} = \frac{\frac{dI}{dt}N - I\frac{dN}{dt}}{N^2} \quad (3.17)$$

$$= \frac{(\alpha - b)IN + \beta SI - \alpha NI + bI^2}{N^2} \quad (3.18)$$

$$(3.19)$$

Teniendo en cuenta que $i = I/N$:

$$\frac{di}{dt} = (\alpha - b)i + \beta(1 - i)i - \alpha i + bi^2 \quad (3.20)$$

Sacando factor común i :

$$\frac{di}{dt} = i[\alpha - b + \beta(1 - i) - \alpha + bi] \quad (3.21)$$

$$= i[\alpha - b + \beta - i\beta - \alpha + bi] \quad (3.22)$$

$$= i[\beta(1 - i) - b(1 - i)] \quad (3.23)$$

$$= i(1 - i)(\beta - b) \quad (3.24)$$

Con ésto ya podemos analizar la progresión o no del plásmido. Puesto que tanto i cómo $1-i$ son siempre positivas, la única manera de que la derivada sea negativa es que $\beta - b < 0$, en cuyo caso la derivada será siempre negativa. Por lo tanto los plásmidos prosperarán sólo si el coeficiente de transmisión β es mayor que la carga del plásmido b .

3.2.2. Forma explícita de FDT

Reordenando la ecuación anterior podemos obtener:

$$\frac{di}{i(1-i)} = (\beta - b)dt \quad (3.25)$$

Lo cual se puede integrar quedando:

$$\int \frac{di}{i(1-i)} = \int (\beta - b)dt \quad (3.26)$$

$$\log i - \log(1-i) = \beta t - bt + k \quad (3.27)$$

Teniendo en cuenta las propiedades de los logaritmos y operando:

$$\log \frac{i}{1-i} = \beta t - bt + k \quad (3.28)$$

$$e^{\log \frac{i}{1-i}} = e^{\beta t - bt + k} \quad (3.29)$$

$$\frac{1-i}{i} = e^{-\beta t + bt - k} \quad (3.30)$$

$$\frac{1}{i} - 1 = e^{-\beta t + bt - k} \quad (3.31)$$

$$\frac{1}{i} = e^{-\beta t + bt + k} + 1 \quad (3.32)$$

$$i = \frac{1}{k_1 e^{-\beta t + bt} + 1} \quad (3.33)$$

3.3. DDT o FDT

Nuestro grupo de investigación ha realizado un experimento (aún sin publicar) para determinar que tipo modelo de transmisión es el más adecuado. En él se midió la cantidad de bacterias transconjugantes (células que no tenían el plásmido y son infectadas) que aparecían en una hora según distintas concentraciones iniciales de susceptibles y portadores del plásmido. A continuación se crearon las predicciones de transconjugantes que debería haber si la transmisión depende de frecuencia o de densidad y se comparó que modelo describe mejor los resultados obtenidos. Los resultados aparecen representados en la figura 3.2 y demuestran que la transmisión depende principalmente de la frecuencia del plásmido y no de la densidad. Por ello de ahora en adelante usaremos el modelo FDT.

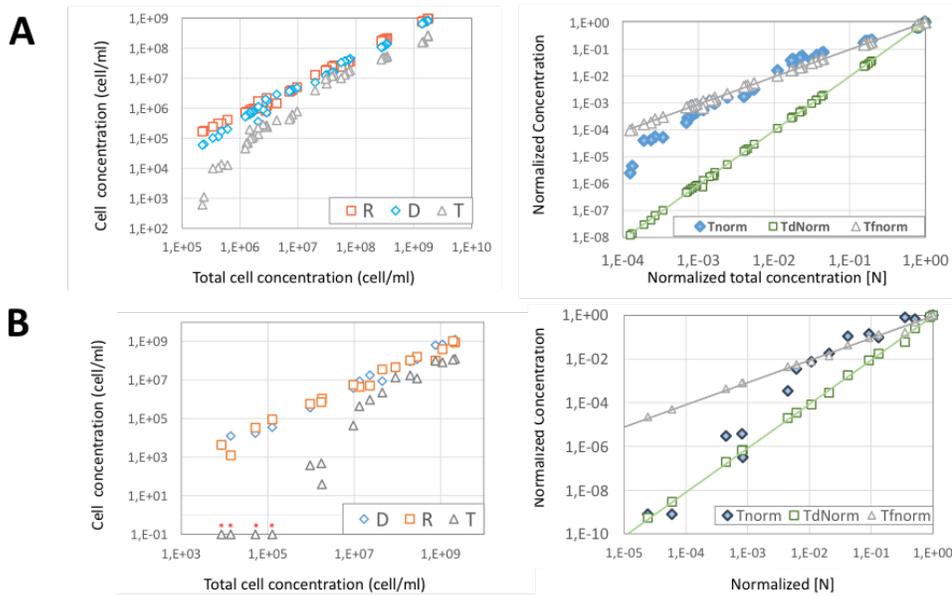


Figura 3.2. Se ha representado la cantidad de transconjugantes producidos por dos plásmidos **A**: R388 y **B**: pOX38. En las gráficas de la izquierda se ha representado el número total de células no infectadas R, de donantes D y de transconjugantes T. A la derecha aparecen los valores de transconjugantes normalizados en función del valor más alto del experimento en azul. En gris aparecen los valores que debería haber alcanzado si la transmisión fuera FDT y en verde si fuera DDT. Se observa cómo los resultados R388 coinciden muy bien con FDT y pOX38 depende de la concentración, pero a concentraciones suficientemente grandes también sigue FDT.

Modelización de las estrategias de inhibición de la transferencia

4.1. Imitar la incompatibilidad entre plásmidos

Al imitar la incompatibilidad conseguimos que tras la división solo una de las células hijas conserve el plásmido. Aunque es cierto que éstas pérdidas pueden producirse de forma natural, es muy poco común por los sistemas toxina-antitoxina antes explicados.

El número de bacterias que pierden el plásmido por cada unidad de tiempo será una fracción de las que se dividan en ese tiempo $(\alpha - b)I$, vamos a llamar a ésta fracción ϵ . Éste será un número entre 0 y 0,5, pues no es posible que más de la mitad de las bacterias pierdan el plásmido, y tampoco puede ser un número negativo. Por lo tanto nuestro sistema, asumiendo FDT, queda:

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = \alpha S - \beta \frac{SI}{N} + \epsilon(\alpha - b)I \\ \frac{dI}{dt} = (\alpha - b)I + \beta \frac{SI}{N} - \epsilon(\alpha - b)I \end{cases} \quad (4.1)$$

Como en el caso anterior vamos a ver que ocurre con la fracción de infectados, que desarrollándolo queda:

$$\frac{di}{dt} = \frac{I'N - IN'}{N^2} \quad (4.2)$$

$$= \frac{[(1 - \epsilon)(\alpha - b)I + \beta \frac{SI}{N}] N - I(\alpha N - bI)}{N^2} \quad (4.3)$$

$$= \alpha i - bi - \epsilon \alpha i + \epsilon bi + \beta si - \alpha i + bi^2 \quad (4.4)$$

$$= i [\epsilon(b - \alpha) + s(\beta - b)] \quad (4.5)$$

A partir de este resultado podemos ver cómo se comportaría la población. Lo primero que observamos es que $\epsilon(b - \alpha)$ es siempre negativo,

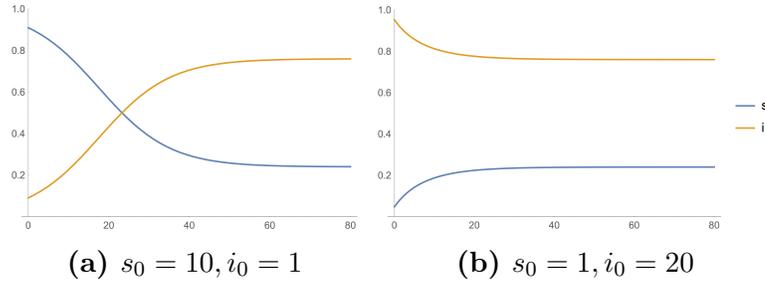


Figura 4.1. Evolución de las poblaciones con plásmido (i) y sin plásmido (s) en el caso de que haya pérdidas del plásmido durante la replicación. Se representan para los valores de $\alpha = 0,41$; $\beta = 0,2$; $b = 0,05$; $\epsilon = 0,1$. Se aprecia cómo independientemente de los valores iniciales, las poblaciones tienden a un equilibrio determinado por las características de crecimiento y de transmisibilidad.

por lo que el plásmido solo se mantendrá si $s(\beta - b) > -\epsilon(b - \alpha)$ para alguna proporción de bacterias susceptibles s entre 0 y 1. En caso contrario la derivada se anula en algún punto, por lo que encontraremos un punto de equilibrio. Este punto de equilibrio se produciría para $s = \frac{\epsilon(\alpha - b)}{(\beta - b)}$. Por simple inspección también se aprecia que si s es mayor que s en el punto de equilibrio, la derivada de i es positiva, luego tiende al equilibrio, y si s es menor la derivada de i es negativa, de nuevo tendiendo al equilibrio. En la figura 4.1 se aparecen dos escenarios con las mismas condiciones de crecimiento y transmisión pero distintas condiciones iniciales, y se observa cómo independientemente del inicio, tienden a un equilibrio.

4.1.1. ¿Puede haber fijación completa?

Hemos dicho que el equilibrio se encuentra en $s = \frac{\epsilon(\alpha - b)}{(\beta - b)}$, a partir de ahí podemos ver el equilibrio desde el punto de vista de i :

$$i = 1 - \frac{\epsilon(\alpha - b)}{(\beta - b)} \quad (4.6)$$

Cómo $\frac{\epsilon(\alpha - b)}{(\beta - b)}$ es siempre mayor que 0, por muy cerca que esté el equilibrio de $i = 1$ nunca lo alcanzará.

Visto de otra manera: si la población de susceptibles desaparece,

su derivada quedaría:

$$\frac{dS}{dt} = \alpha S - \beta \frac{SI}{N} + \epsilon(\alpha - b)I = \epsilon(\alpha - b)I \quad (4.7)$$

Al ser la derivada positiva, concluimos que S no puede tener un punto de equilibrio en 0.

4.1.2. ¿Puede haber eliminación completa?

Por el contrario, con los fármacos que producen pérdidas si es posible conseguir la erradicación del plásmido. Siempre que $-\epsilon(b - \alpha) > (\beta - b)$ la derivada de i será negativa hasta llegar a $i=0$. En conclusión, con ésta medida es posible eliminar un plásmido que tendería a prosperar, y en cualquier caso siempre impedimos que haya fijación completa.

4.2. Inhibición de la Conjugación

Si inhibimos completamente la conjugación es previsible que el plásmido desaparezca de la población. Si en la ecuación de FDT sustituimos $\beta = 0$ nos queda:

$$\frac{di}{dt} = i(1 - i)(\beta - b) = -isb \quad (4.8)$$

Que al ser siempre negativa implica que el plásmido desaparecerá. Ahora bien, lo previsible es que los fármacos no actúen perfectamente y por lo tanto la inhibición no sea completa. ¿Qué nivel de inhibición es necesario para que el plásmido sea eliminado? Igualando nuestra ecuación para I a 0 obtenemos:

$$\frac{di}{dt} = i(1 - i)(\beta - b) = 0 \quad (4.9)$$

Ésto ocurre si $i=0$ o si $\beta = b$, es decir que hay que disminuir β hasta que sea menor al coste de llevar el plásmido. A partir de ahí, cuanto más descienda antes se producirá la eliminación completa.

4.3. Resistencia a la conjugación

Una posibilidad que puede existir es que algunas bacterias sean resistentes a la conjugación. Cultivar estas bacterias en laboratorio, o crearlas por edición genética para después introducir las en la población sería una especie de *vacunación* de la flora. Esta resistencia suele producirse por sistemas de Restricción-Modificación o CRISPR-Cas, que implican un coste energético. El sistema (asumiendo FDT) nos quedaría así:

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = \alpha S - \beta \frac{SI}{N} \\ \frac{dI}{dt} = (\alpha - b_1)I + \beta \frac{SI}{N} \\ \frac{dR}{dt} = (\alpha - b_2)R \end{cases} \quad (4.10)$$

De nuevo vamos a considerar que α , $\alpha - b_1$ y $\alpha - c_2$ son mayores que 0, pues lo contrario implicaría la inviabilidad o bien de la población resistente al plásmido, o bien de la población resistente a antibióticos. Al igual que previamente vamos a definir la función r minúscula como la fracción que comprenden las células con mecanismos de resistencia al plásmido respecto del total: $r = \frac{R}{N}$. Con ello podemos reescribir el sistema como:

$$\begin{cases} \frac{ds}{dt} = s[(b_1 - \beta)i + cr] \\ \frac{di}{dt} = i[r(b_2 - b_1) + s(\beta - b_1)] \\ \frac{dr}{dt} = r[b_1i + b_2(r - 1)] \end{cases} \quad (4.11)$$

A simple vista ya apreciamos ciertas cosas:

- Si $b_1 > \beta$ tendremos que $\frac{ds}{dt} > 0$ siempre y $\frac{di}{dt} < 0$. Luego como ya vimos en el modelo de dos poblaciones una condición para que el plásmido prospere es que la carga energética sea inferior al coeficiente de transmisión.
- Si $b_2 > b_1$ (y se cumple el punto anterior) la derivada de i es siempre positiva, luego el plásmido prospera. Por lo tanto para que la población resistente sea viable debe tener un *fitness cost* menor que el del plásmido.
- Cuando r tiende a 1, s crece e i decrece.
- Cuando s tiende a 1, i crece.
- Cuando i tiende a 1, r crece, pero si i es muy pequeño r decrece.

En definitiva, parece observarse un cierto comportamiento cíclico. Vamos a estudiar los puntos de estabilidad del sistema para ver si es posible que exista un equilibrio o si el sistema oscila siempre. El primer requisito para que existan sería que el valor de las derivadas fuera $(\frac{ds}{dt}, \frac{di}{dt}, \frac{dr}{dt}) = (0, 0, 0)$; pues al ser nulas las derivadas implicaría que no hay crecimiento de una población sobre las otras. Obviamos la solución $(S, I, R) = (0, 0, 0)$ o las que impliquen que $R = 0$ pues al ser la derivada de R positiva, ésto solo puede ocurrir si $R_0 = 0$, en cuyo caso tendríamos el sistema inicial. En nuestro modelo la derivada de I es siempre positiva, por lo que I nunca valdrá 0 (aunque la derivada de i sea negativa, la población de bacterias con el plásmido siempre crecerá, aunque cada vez sea menor en proporción). Finalmente podría darse el caso de que $S = 0$, pero en ése caso nos quedarían dos poblaciones independientes, I y R , con crecimientos siempre positivos, por lo que tampoco habría equilibrio. Por lo tanto no puede existir un punto de estabilidad con alguno de los componentes nulos. Así pues, en caso de existir un punto de equilibrio debería cumplirse que:

$$\begin{cases} b_1 i + b_2 (r - 1) = 0 \\ r(b_2 - b_1) + (\beta - b_1) = 0 \\ [(b_1 - \beta)i + b_2 r] = 0 \end{cases} \quad (4.12)$$

Resolviendo el sistema nos queda el siguiente punto de equilibrio no trivial: $(s, i, r) = (\frac{b_1 - b_2}{\beta}, \frac{b_2}{\beta}, 1 - \frac{b_1}{\beta})$. Puesto que las tres poblaciones suman siempre uno, podemos reducir el sistema a uno de dos ecuaciones sustituyendo $s = 1 - r - i$ en las ecuaciones de i y r :

$$\begin{cases} \frac{di}{dt} = i[r(b_2 - b_1) + (1 - i - r)(\beta - b_1)] \\ \frac{dr}{dt} = r[b_1 i + b_2 (r - 1)] \end{cases} \quad (4.13)$$

Analizando la matriz Jacobiana en el punto de equilibrio obtenemos:

$$J = \begin{pmatrix} (b_2 - b_1) \left(1 - \frac{b_1}{\beta}\right) + \left(\frac{b_1}{\beta} - \frac{b_2}{\beta}\right) (\beta - b_1) + \frac{b_2(b_1 - \beta)}{\beta} & \frac{b_2(b_2 - \beta)}{\beta} \\ b_1 \left(1 - \frac{b_1}{\beta}\right) & b_2 \left(1 - \frac{b_1}{\beta}\right) \end{pmatrix} \quad (4.14)$$

Cuyos autovalores son $-\frac{\sqrt{b_2} \sqrt{(b_1 - \beta)(b_1 - b_2)}}{\sqrt{\beta}}, \frac{\sqrt{b_2} \sqrt{(b_1 - \beta)(b_1 - b_2)}}{\sqrt{\beta}}$. Ambos autovalores son puramente imaginarios en las condiciones que hemos dado a nuestro sistema ($\beta > b_1$ y $b_1 > b_2$), por lo tanto nos encontramos con un equilibrio estable en el sentido de Lyapunov. En la figura 4.2 se encuentra una simulación del modelo en la cual podemos ver como las proporciones tienen un comportamiento cíclico.

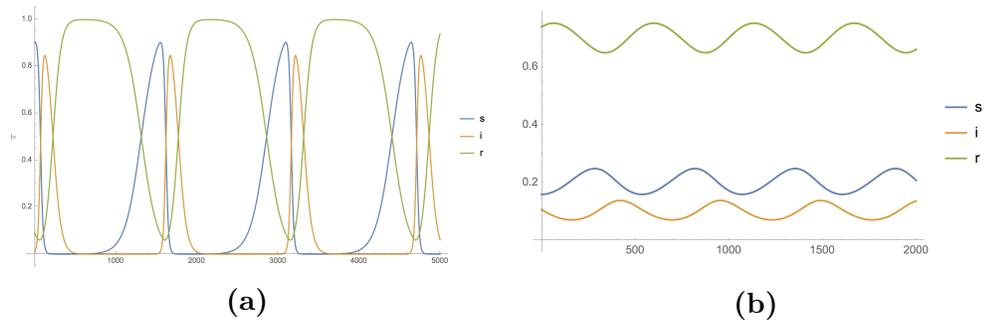


Figura 4.2. Simulación del modelo con tres poblaciones para los siguientes parámetros: $\alpha = 0,031$, $\beta = 0,1$, $b_1 = 0,03$, $b_2 = 0,01$. Las concentraciones iniciales son (a): $S=10$, $I=100$, $R =10$ (b): $S=15$, $I=10$, $R =70$. Se ve cómo cuando estamos cerca del punto de equilibrio (b) las oscilaciones del sistema son mucho más pequeñas mientras que si nos alejamos son más amplias.

Discusión

En base a los resultados experimentales hemos asumido un modelo de transmisión basado en la frecuencia. El modelo FDT es el que se suele utilizar en enfermedades de transmisión sexual, pues asume que el número de contactos es prácticamente fijo. La conjugación bacteriana requiere un tiempo y un gasto energético por lo que las bacterias no puedan aumentar el número de conjugaciones indiscriminadamente.

De las tres estrategias comparadas, solo dos predicen una eliminación completa del plásmido: inhibir la conjugación e imitar la incompatibilidad entre plásmidos. Aún sin datos cuantitativos podemos predecir en que caso una estrategia será más útil que la otra. El umbral bajo el que la transmisión del plásmido quedaría inhibida es $\epsilon(\alpha - b) > (\beta - b)$ para la incompatibilidad entre plásmidos y $\beta < b$ para la inhibición de la conjugación (en la primera ecuación lo que cambiaría según el fármaco usado sería ϵ y en la segunda β). En ambos casos la acción del fármaco debe ser mayor cuanto mayor sea la diferencia $\beta - b$, es decir que si el plásmido es muy infectivo necesitaremos un fármaco que bloquee mejor la inhibición o que produzca más pérdidas de plásmido.

Ahora bien, en el umbral de la incompatibilidad entre plásmidos vemos que ϵ debe ser menor cuanto mayor sea $\alpha - b$, o sea que ésta estrategia será más útil cuando el plásmido produzca un coste de energía b muy pequeño. Dicho de otro modo, si el plásmido depende mucho de la transferencia vertical (a su descendencia) para sobrevivir la estrategia de imitar la incompatibilidad entre plásmidos (que en definitiva ataca en el momento de la división) será más efectiva. Por el contrario cuando el plásmido dependa de más de la conjugación será más útil la inhibición de la conjugación. Por lo tanto los resultados son coherentes con lo que podríamos esperar *a priori*.

Por otra parte, aunque no existan datos cuantitativos, lo previsible es que $\epsilon < 0,5$, pues como ya explicamos una de las dos células hijas mantendrá el plásmido. Sin más datos es imposible saber cómo afec-

ta ésta restricción a la realidad, pero es algo a tener en cuenta frente a la inhibición de la conjugación, que no tiene ninguna aparente limitación. De ambas estrategias, que sepamos, solo la inhibición de la conjugación ha demostrado ser capaz de eliminar un plásmido de la población.[6]

Finalmente la estrategia de introducir cepas resistentes a la acción del plásmido produce efectos aparentemente caóticos, con oscilaciones entre cepas con y sin plásmido. La estrategia de inmunizar a la población es sin duda la más útil para prevenir infecciones en humanos, pero no parece ser exportable a la lucha contra los plásmidos. Aún así estos resultados deben tomarse con cautela, pues hay algunas limitaciones del estudio. Una pregunta que se puede plantear para futuras investigaciones es qué ocurriría si la transmisión tiende a depender de densidad cuando la cantidad de infectados es pequeña, ¿seguiría habiendo éstas oscilaciones? Por otra parte hemos asumido un modelo determinista, pero cuando la cantidad de bacterias infectadas es muy baja los fenómenos estocásticos pueden producir una pérdida del plásmido. Si en un momento dado hay cinco bacterias con el plásmido, hay fenómenos que pueden eliminar el plásmido, como que las cinco sean eliminadas por neutrófilos, o se eliminen por fluidos corporales... Por ello sería interesante utilizar una aproximación no determinista a los casos en los que i se acerca mucho a 0. Es más, al utilizar ecuaciones con números reales estamos abriendo la posibilidad a que en los momentos en que i sea muy bajo haya de hecho un número de plásmidos entre 0 y 1. Asumir que en un momento haya 0,5 plásmidos y que a partir de ahí vuelva a infectarse la población no es real.

Bibliografía

- [1] Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British Journal of Experimental Pathology*. 1929;10(3):226–236.
- [2] Abraham EP, Chain E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*. 1940;146(3713):837–837.
- [3] Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos : una crisis global Antibiotic resistance : A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015;33(10):692–699.
- [4] Cooper MA, Shlaes D. Fix the antibiotics pipeline. *Nature*. 2011 apr;472(7341):32–32.
- [5] Coates A, Hu Y, Bax R, Page C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002;1(11):895–910.
- [6] Williams JJ, Hergenrother PJ. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2008 aug;12(4):389–399.
- [7] Diene SM, Abat C, Rolain Jm, Raoult D. How artificial is the antibiotic resistance definition? *The Lancet Infectious Diseases*. jul;(7):690.
- [8] Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(0095-1137 (Print)):5–14.
- [9] Pakzad I, Zayyen Karin M, Taherikalani M, Boustanshenas M, Lari AR. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance

- in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. *GMS hygiene and infection control*. 2013;8(2):Doc15.
- [10] Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(10):1471–1485.
- [11] FLENSBURG J, SKÖLD O. Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. *European Journal of Biochemistry*. 1987;162(3):473–476.
- [12] Watanabe T. INFECTIVE HEREDITY OF MULTIPLE DRUG RESISTANCE IN BACTERIA. *Bacteriological Reviews*. 1963 03;27(1):87–115.
- [13] Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature reviews Microbiology*. 2006 jan;4(1):36–45.
- [14] Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 sep;3(9):711–721.
- [15] Martínez JL, Baquero F, Andersson DI. Predicting antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2007 dec;5(12):958–965.
- [16] Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national database study. *Lancet*. 2005;365(9459):579–587.
- [17] Westra ER, Staals RHJ, Gort G, Høgh S, Neumann S, de la Cruz F, et al. CRISPR-Cas systems preferentially target the leading regions of MOB-conjugative plasmids. *RNA Biology*. 2013 mar;10(5):749–761.
- [18] Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F. Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010 aug;74(3):434–452.
- [19] Johnson CM, Grossman AD. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual Review of Genetics*. 2015 nov;49(1):577–601.
- [20] Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2004 may;2(5):414–424.

- [21] Edwards JS, Betts L, Frazier ML, Pollet RM, Kwong SM, Walton WG, et al. Molecular basis of antibiotic multiresistance transfer in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 jan;110(8):2804–2809.
- [22] BEGON M, BENNETT M, BOWERS RA, FRENCH NA, HAZEL SA, TURNER J. A clarification of transmission terms in host-microparasite models: numbers, densities and areas. *Epidemiology and Infection*. 2002;129(01):147–153.