

Optimización de un protocolo de conjugación bacteriana *in vitro* de plásmidos portadores de genes de resistencia antibiótica

Optimization of an *in vitro* bacterial conjugation protocol of plasmids carrying antibiotic resistance genes



Mezclas conjugativas sobre filtros de nitrocelulosa. Fotografía del autor.

Trabajo de Fin de Grado

Álvaro Luis González

Tutor: Eduardo Pérez Roth

(Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética)

Cotutor: Dácil Hernández Mesa (IPNA-CSIC)

Grado en Biología. Curso 2021-22

Índice

Resumen	1
Abstract.....	1
1. Introducción	2
1.1 Resistencia bacteriana a los antibióticos: un problema de salud global	2
1.1.1 Especies resistentes a antibióticos de gran relevancia	2
1.2 Papel de la conjugación en la dispersión de la resistencia a antibióticos	3
1.3 Plásmidos de resistencia a antibióticos	4
1.3.1 Plásmidos de resistencia a mupirocina	5
1.3.2 Técnicas de estimación de la tasa de conjugación.....	7
2. Objetivos	9
3. Material y métodos.....	10
3.1 Microorganismos y plásmidos utilizados	10
3.2 Medios de cultivo	11
3.3 Condiciones de cultivo y conservación	11
3.4 Preparación de stocks de antibióticos	11
3.5 Ensayos de conjugación mediante co-cultivo y selección de transconjugantes	12
3.5.1 Conjugaciones en filtros de nitrocelulosa	12
3.5.2 Selección de transconjugantes y donadoras	13
3.5.3 Cálculo de la frecuencia de conjugación	13
3.6 Estudio del efecto inhibitor de la conjugación.....	14
4. Resultados y discusión	15
4.1 Puesta a punto del protocolo de conjugación	15
4.2 Frecuencia de conjugación del plásmido pGO400	18
4.2.1 Estudio del efecto del tiempo de conjugación	19
4.2.2 Estudio del efecto del inhibidor de la conjugación	20
4.3 Estudio de otros plásmidos portadores del gen <i>ileS2</i>: plásmido pPR9 y pPR2	21
5. Conclusiones.....	25
6. Conclusions.....	26
7. Referencias	27

Resumen

La resistencia a antibióticos en bacterias se presenta en la actualidad como uno de los mayores riesgos para la salud pública. La conjugación bacteriana de plásmidos está íntimamente ligada a la dispersión de resistencias a los antibióticos, y muchos plásmidos de origen natural portan genes de resistencia. Los métodos para cuantificar y comparar la eficiencia de conjugación de plásmidos en condiciones de laboratorio tienen gran utilidad en investigación. Entre otras cosas, permiten estudiar la capacidad de transferencia conjugativa de los plásmidos y la frecuencia de transmisión. Además, sirven para llevar a cabo ensayos de inhibición de la conjugación en la búsqueda de compuestos candidatos para frenar la dispersión de la resistencia antibiótica. En este trabajo de fin de grado, se planteó como objetivo la puesta a punto de un protocolo *in vitro* de medida de la eficiencia de conjugación bacteriana de plásmidos, basado en selección con antibióticos. El protocolo optimizado permitió comprobar la capacidad conjugativa de plásmidos portadores del gen *ileS2* y calcular la frecuencia de conjugación de los mismos.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, conjugación, plásmidos, mupirocina.

Abstract

Antibiotic resistance in bacteria is currently one of the greatest risks to public health. Bacterial plasmid conjugation is intimately linked to the spread of antibiotic resistance, and many naturally occurring plasmids carry resistance genes. Methods to quantify and compare plasmid conjugation efficiency under laboratory conditions have great utility in research. Among other uses, they make it possible to study the conjugative transfer capacity of plasmids and the frequency of transmission. In addition, they serve to carry out conjugation inhibition assays in the search for candidate compounds to stop the spread of antibiotic resistance. In this final degree work, the objective was to develop an *in vitro* protocol for measuring the efficiency of bacterial conjugation of plasmids, based on selection with antibiotics. The optimized protocol allowed to test the conjugation capacity of plasmids carrying the *ileS2* gene and to calculate their conjugation frequency.

Keywords: antibiotic resistance, conjugation, plasmids, mupirocin.

1. Introducción

1.1 Resistencia bacteriana a los antibióticos: un problema de salud global

Un antibiótico es una sustancia química activa contra el crecimiento bacteriano producida por un ser vivo. El gran salto a la era moderna de los antibióticos se dio en 1928 con la síntesis de la penicilina por Alexander Fleming a partir del hongo *Penicillium notatum* ([Sengupta et al., 2013](#)). Aunque durante los años 1940s, la penicilina fue un compuesto eficaz para el tratamiento de infecciones bacterianas entre los soldados que lucharon en la Segunda Guerra Mundial, tan solo 10 años después la resistencia a la penicilina comenzó a ser un grave problema para la salud pública ([Ventola, 2015](#)).

Una bacteria es resistente a un antibiótico cuando esta adquiere o desarrolla la capacidad de sobrevivir en presencia de un compuesto que previamente causaba su muerte o impedía su desarrollo. Se trata de un problema de importancia global, ya que según el [Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos](#) (CDC, de sus siglas en inglés), solo en EE. UU. ocurren 2,8 millones de infecciones por bacterias resistentes a antibióticos cada año, de las cuales más de 35.000 acaban en fallecimientos.

Inicialmente la resistencia a los antibióticos no suponía un problema importante, ya que constantemente se desarrollaban nuevos compuestos con los que tratar las infecciones bacterianas. Sin embargo, en la actualidad cada vez son más frecuentes las bacterias resistentes a antibióticos debido tanto al abuso como al mal uso de antibióticos realizado por los humanos, incluyendo en la agricultura y ganadería ([Pidcock, 2012](#)). Además, debido al poco beneficio económico y a la alta regulación del sector, el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos se ha visto frenado, generando un mayor avance de la resistencia global a antibióticos ([Alemán, 2013](#)).

1.1.1 Especies resistentes a antibióticos de gran relevancia

El [CDC](#) propone una clasificación para un gran número de especies de bacterias en función a si suponen una amenaza urgente, seria o preocupante para la salud pública. Dentro de las amenazas urgentes se encuentran especies tales como *Clostridium difficile*, *Neisseria gonorrhoeae* o las enterobacterias resistentes a carbapenémicos; mientras que otras especies como *Staphylococcus aureus*, muy frecuentes en el

ambiente, suponen un nivel de amenaza serio. Así, en relación a este último caso, actualmente el 95% de infecciones por *S. aureus* en todo el mundo no pueden ser tratadas con antibióticos comunes como la penicilina y ampicilina, por lo que para su eliminación se ha recurrido a la meticilina. Sin embargo, desde los años 1960s cada vez son más frecuentes las cepas con la habilidad de resistir a dicho compuesto, los denominados *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM). Estudios recientes muestran que el 64,4% de las infecciones por *S. aureus* en las unidades de cuidados intensivos son causadas por cepas SARM, que además de infecciones más peligrosas para el paciente, también generan estancias hospitalarias más largas, mayor mortalidad y mayores costes económicos por la necesidad de ser manejadas con tratamientos alternativos ([Gillapsy e landolo, 2009](#)).

1.2 Papel de la conjugación en la dispersión de la resistencia a antibióticos

El origen de la resistencia a un antibiótico por parte de una bacteria se debe a dos procesos: la mutación y la transferencia horizontal de genes (HGT, del inglés *Horizontal Gene Transfer*). Las mutaciones capaces de generar resistencia a un antibiótico pueden ocurrir en tres tipos de genes: los que codifican la diana del antibiótico, los que codifican los transportadores del antibiótico o los que codifican los reguladores de la expresión de los transportadores y elementos descontaminantes de un antibiótico ([Martínez, 2014](#)).

La HGT desempeña un papel fundamental en la adquisición de resistencia a antibióticos. Debido a que los compuestos antibióticos son sintetizados por microorganismos, los productores de los mismos poseen genes que les aportan resistencia para asegurar su propia supervivencia. Así, mediante los diferentes mecanismos de HGT pueden compartir esta información genética con otras bacterias de su especie, incluso de otras diferentes, propagando la resistencia ([Martínez, 2014](#)).

La conjugación bacteriana es uno de los principales mecanismos de HGT, junto con la transducción y transformación. Se considera un modelo “sexual” de transferencia de información genética en bacterias, ya que el material cromosómico de dos tipos de células se une en un proceso definido y programado. Es el único de los procesos que implica contacto célula-célula, involucrando solo una porción, normalmente pequeña,

del genoma de la célula donadora y el genoma completo de la receptora; a diferencia de en la reproducción sexual de eucariotas, en la que interacción ocurre entre el juego cromosómico completo de ambas células parentales ([Raleigh y Low, 2013](#)).

1.3 Plásmidos de resistencia a antibióticos

Un plásmido es un fragmento de ADN extracromosómico autorreplicable, consistente de una doble cadena de ADN de un tamaño entre 4 y 400 kilobases que puede transferirse entre individuos de la misma o de diferentes especies bacterianas ([Grumezescu et al., 2016](#)). Suelen contener genes involucrados en la desintoxicación, virulencia, interacciones ecológicas o resistencia a antibióticos ([Smillie et al., 2010](#)).

Existen dos sistemas de genes implicados para la movilidad de los plásmidos: el sistema de movilización (MOB, del inglés *Mobility*), que contiene su propio origen de replicación (oriT, en violeta) y genes para la síntesis de la relaxasa (en rojo) y de la proteína de acoplamiento tipo IV (T4CP, en verde); y el sistema de formación de poros de apareamiento (MPF, del inglés *Mating Pair Formation*), encargado de la formación de un sistema de secreción tipo 4 (T4SS, del inglés *Type 4 Secretion System*; en azul). Así, según la presencia o ausencia de los sistemas MOB y MPF, los plásmidos se pueden clasificar en función de su capacidad de movilidad. Los plásmidos autotransmisibles o conjugativos son aquellos que poseen tanto el sistema MOB como el MPF; los movilizables son aquellos que solo contienen sistema MOB y utilizan el sistema MPF de otro elemento móvil presente en la célula; y los no movilizables son aquellos que carecen de ambos sistemas y se difunden por medio de transformación y transducción ([Figura 1](#)) ([Smillie et al., 2010](#)).

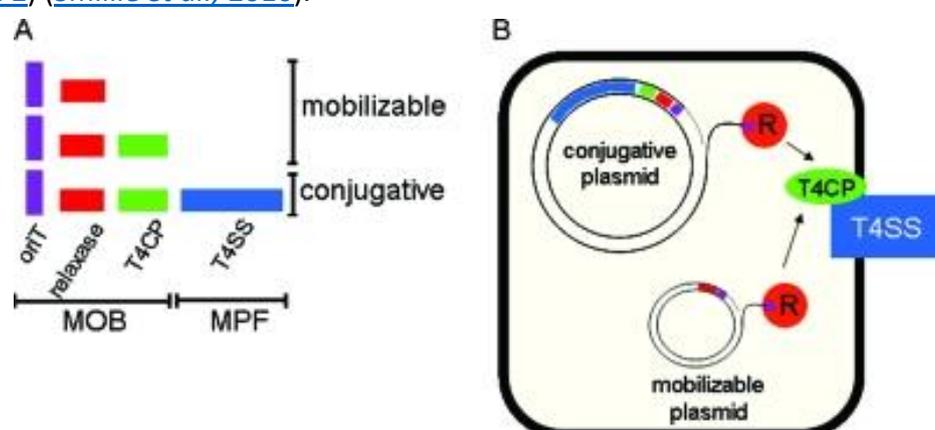


Figura 1: (A) Esquema de los componentes de los plásmidos transmisibles (B) Esquema de las interacciones durante el proceso de conjugación ([Smillie et al., 2010](#))

Los plásmidos conjugativos también se conocen como factores masculinos, conjugones, transferones o factores de fertilidad. Son los principales responsables de la diseminación, tanto vertical como horizontal de resistencia a antibióticos, pudiendo modificar el nivel de resistencia en base al número de copias del plásmido que se transmitan ([Grumezescu et al., 2016](#)).

1.3.1 Plásmidos de resistencia a mupirocina

Uno de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones como las causadas por SARM es la mupirocina o ácido pseudomónico A. Este compuesto es sintetizado mediante fermentación sumergida de *Pseudomonas fluorescens*, y actúa como un potente inhibidor de la enzima isoleucil-ARNt sintetasa (IleRS). ([Ward y Richards, 1995](#)).

Al igual que ha ocurrido con el resto de antimicrobianos, con la exposición prolongada a la mupirocina han surgido nuevas cepas SARM también resistentes a dicho compuesto. Estas cepas presentan resistencia transmisible de alto nivel a la mupirocina (Hi-Mup^r) gracias a la síntesis de una IleRS extra codificada por el gen *ileS2*, albergado generalmente en plásmidos conjugativos de diferentes tamaños y patrones de restricción. La concentración mínima inhibitoria (MIC, del inglés *Minimum Inhibitory Concentration*) en los casos de Hi-Mup^r es de $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ ([Kizerwetter-Świda et al., 2019](#))

Estos plásmidos pertenecen a la familia pSK41/pGO1 de plásmidos de multirresistencia bacteriana. Una característica general de este grupo es que los genes de resistencia antibiótica van flanqueados por copias de la secuencia de inserción IS257, modificando así la evolución de cada uno de los plásmidos y sus cualidades de actuación ([Pérez-Roth et al., 2011](#)).

En [Pérez-Roth et al., 2010](#) se secuenció la totalidad del plásmido pPR9 (41,7 kb) y se comprobó como este posee dos regiones claramente diferenciadas: una primera estructural (en negro) portadora de los genes encargados de la replicación, mantenimiento y transferencia del plásmido; y otra accesoria (en gris) que contiene los genes de resistencia a antibióticos, entre ellos el gen *ileS2*, y las diversas secuencias de inserción ([Figura 2](#)).

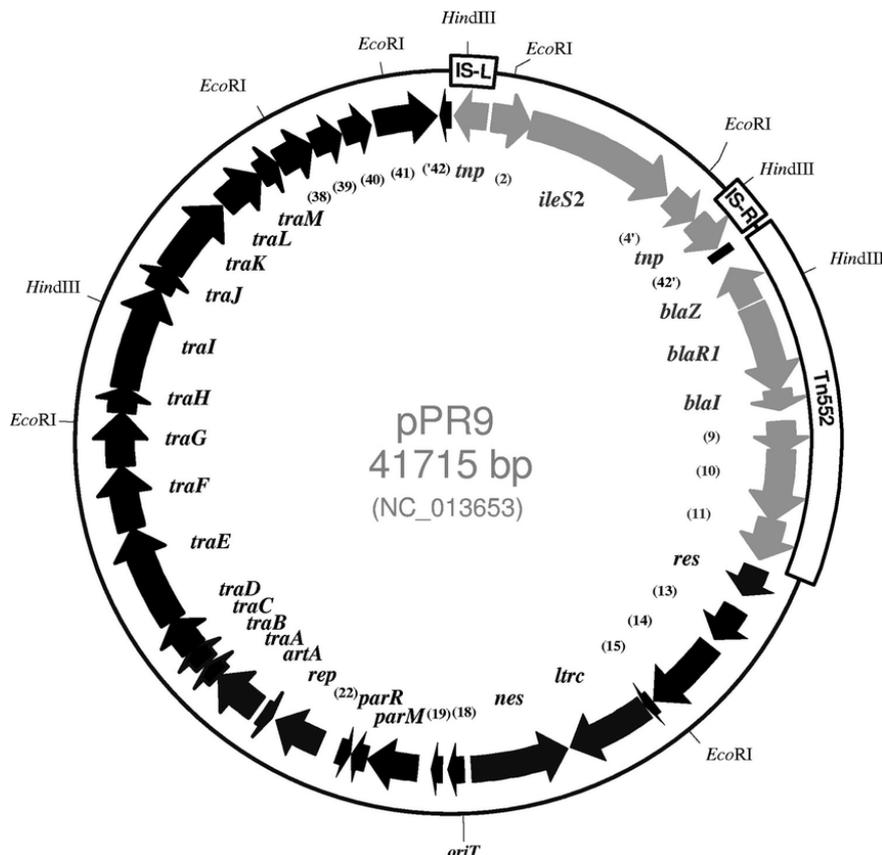


Figura 2: Mapa físico y genético del plásmido de multirresistencia de *S. aureus* pPR9, portador del gen *ileS2* ([Pérez-Roth, 2010](#))

Otro importante plásmido conjugativo portador de resistencia a mupirocina es el pGO400 (34 kb), que deriva del plásmido pGO1 (54kb). Ambos plásmidos son estructuralmente idénticos según análisis de hibridación y de patrones de restricción para sus genes de transferencia (*trs*) y sus sitios de origen de transferencia y replicación vegetativa (*oriT* y *oriV*). Sin embargo, los fragmentos de pGO1 que codifican para la resistencia de diversos antibióticos, se sustituyen en pGO400 por una región de menor tamaño portadora del gen de resistencia a mupirocina (*Hi-Mup^I*). Gracias a esta modificación, pGO400 se presenta como un plásmido portador de resistencia a

mupirocina con una estructura más sencilla que la de otros como pPR9 ([Figura 3](#)) ([Morton et al., 1995](#)).

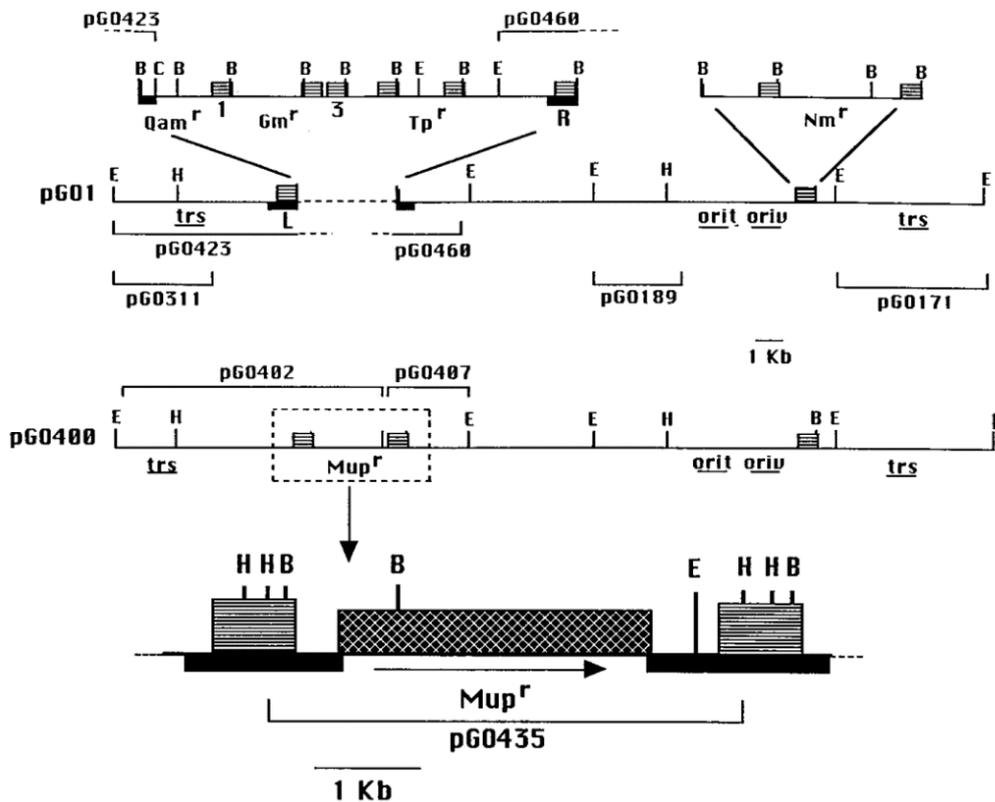


Figura 3: Mapa de los sitios de restricción y genes comunes de los plásmidos pG01 y pG0400 ([Morton et al., 1995](#))

1.3.2 Técnicas de estimación de la tasa de conjugación

pPR9 y pG0400 son ejemplos de la increíble adaptabilidad presente en los plásmidos conjugativos, demostrando la facilidad con la que la resistencia a antibióticos puede transmitirse entre bacterias y generando importantes riesgos en el ámbito clínico.

Frente a casos de infección por una bacteria resistente a antibióticos, un primer experimento para comprobar si la resistencia es transmisible mediante conjugación puede ayudar a averiguar si esta capacidad se ubica en plásmidos. En caso afirmativo, conocer la tasa de conjugación del plásmido resulta fundamental para comprender el funcionamiento y expansión de la resistencia *in vivo* ([Simonsen et al., 1990](#)). Según se recoge en [Huisman et al., 2022](#), existen más de 10 métodos diferentes que permiten cuantificar la tasa de conjugación de un plásmido.

1.3.2.1 Métodos basados en la densidad de población

Estos métodos estiman el ratio entre densidades de poblaciones bacterianas donadoras, receptoras y transconjugantes para el plásmido de estudio. Para su obtención, se basan en la realización de cultivos selectivos que contienen distintos agentes antibióticos, permitiendo el desarrollo por separado de bacterias en función a si portan, carecen o reciben por conjugación el plásmido de resistencia. Estos protocolos destacan por su facilidad para ser llevados a cabo, aunque los resultados pueden verse afectados según la tasa de conjugación del propio plásmido, el ratio inicial de donadores/receptores o el tiempo que se permita que ocurra la conjugación ([Huisman et al., 2022](#)).

1.3.2.2 Métodos basados en la dinámica de poblaciones

Estos modelos fueron desarrollados para discernir entre la influencia de la transferencia vertical y horizontal de los plásmidos. Para calcular la tasa de conjugación, [Simonsen et al. \(1990\)](#), propusieron utilizar la regresión lineal en la fase exponencial o estacionaria de crecimiento de las colonias tanto donadoras, como receptoras y transconjugantes ([Huisman et al., 2022](#)).

Aunque los métodos basados en dinámica de poblaciones permiten obtener resultados con menor variación entre experimentos con diferentes condiciones con tan solo una medida, se necesita tener datos sobre el ratio de crecimiento y la densidad inicial de la población de estudio. Además, el método de Simonsen no tiene en cuenta las diferencias entre las tasas de crecimiento entre cepas, y tampoco aporta una cuantificación de las diferencias en la tasa de conjugación debidas a qué cepas actúan como donantes o transconjugantes ([Huisman et al., 2022](#)).

Por todo esto, resulta fundamental el desarrollo de métodos estables y sencillos que permitan comprobar, y preferiblemente cuantificar, la capacidad conjugativa de plásmidos de resistencia a antibióticos que suponen un riesgo para la salud pública.

2. Objetivos

Debido a la gran importancia que desempeña la conjugación bacteriana en los procesos de transferencia de genes de resistencia a los antibióticos, en este trabajo se planteó la puesta a punto de un protocolo *in vitro* para estudiar la capacidad conjugativa de plásmidos portadores del gen *ileS2* que confieren la resistencia a altos niveles de mupirocina, y que permitiera cuantificar la frecuencia de conjugación de los plásmidos.

Para abordar dicho objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Optimización de las condiciones experimentales de un protocolo de conjugación *in vitro* en soporte sólido usando filtros de nitrocelulosa y selección antibiótica, para estudiar la capacidad de transferencia de plásmidos de resistencia.
2. Determinar y comparar las tasas o frecuencias de conjugación de los plásmidos portadores del gen *ileS2* en estudio.
3. Evaluar la posible modificación de la tasa de conjugación en presencia de un compuesto químico candidato utilizando el protocolo *in vitro* optimizado

3. Material y métodos

3.1 Microorganismos y plásmidos utilizados

En este trabajo se utilizaron cepas de referencia de *S. aureus*, así como aislados clínicos de *S. aureus* recolectados en el Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC) durante diferentes estudios realizados en el periodo 2002-2009.

- *S. aureus* WBG541. Cepa libre de plásmidos utilizada como receptora en los experimentos de conjugación. Esta cepa tiene resistencia cromosómica a rifampicina (Rf) y al ácido fuscídico (Fa). Proporcionada por el Prof. Warren B. Grubb, Curtin University of Technology, Australia.
- *S. aureus* NRS107. Cepa que contiene el plásmido conjugativo pGO400 ([Morton et al., 1995](#)), el cual codifica el gen *ileS2* que proporciona resistencia a altos niveles de mupirocina (Hi-Mup^r, MIC ≥ 1024 µg/mL). Además, esta cepa tiene resistencia cromosómica a novobiocina (Nv). Dicha cepa se empleó como donadora en los experimentos de conjugación. Fue obtenida de la colección NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *S. aureus*).
- *S. aureus* HUNSC491. Aislado clínico de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) portador del plásmido conjugativo pPR9 ([Pérez-Roth et al., 2010](#)), el cual codifica el gen *ileS2* que proporciona resistencia a altos niveles de mupirocina (Hi-Mup^r, MIC ≥ 1024 µg/mL). Además, tiene resistencia cromosómica a oxacilina (Ox). Esta cepa se empleó como donadora en los experimentos de conjugación. Fue recolectada en el Hospital Universitario Nuestra Señora de La Candelaria ([Pérez-Roth et al., 2006](#)).
- *S. aureus* HUNSC485. Aislado clínico de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) portador del plásmido conjugativo pPR2 ([Pérez-Roth et al., 2006](#)), el cual codifica el gen *ileS2* que proporciona resistencia a altos niveles de mupirocina (Hi-Mup^r, MIC ≥ 1024 µg/mL). Además, tiene resistencia cromosómica a oxacilina (OX). Esta cepa se empleó como donadora en los experimentos de conjugación. Fue recolectada en el Hospital Universitario Nuestra Señora de La Candelaria ([Pérez-Roth et al., 2006](#)).

3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados se adquirieron en forma de preparado comercial y la composición de cada uno de ellos se muestra en la [Tabla 1](#).

Tabla 1: Medios de cultivo utilizados

Medio de cultivo	Composición (g/L)	
LB agar (Lennox) (Condalab®)	Agar bacteriológico	15
	Triptona	10
	Cloruro sódico	5
	Extracto de levadura	5
LB broth (Lennox) (Condalab®)	Triptona	10
	Cloruro sódico (NaCl)	5
	Extracto de levadura	5
BHI agar (Brain Heart Infussion) (Condalab®)	Agar bacteriológico	15
	Dextrosa	2
	Mezcla de peptona	10
	Infusión de cerebro de ternera	7,5
	Infusión de corazón de vaca	10
	Fosfato disódico	2,5
	Cloruro sódico	5

3.3 Condiciones de cultivo y conservación

Las cepas se crecieron rutinariamente en medio LB sólido y líquido a 37°C durante toda la noche (*o/n*). La conservación de las cepas y aislados clínicos se realizó en viales [Microbank \(Pro-lab diagnostics\)](#) a -80°C. Para comprobar la buena conservación y viabilidad de los microorganismos conservados, se realizaron siembras en placas de LB.

3.4 Preparación de stocks de antibióticos

Las cepas se seleccionaron, tanto en medio líquido como en medio sólido, usando los antibióticos correspondientes, preparados según las instrucciones del fabricante en stocks de concentración 1000X como se muestra en la [Tabla 2](#).

Tabla 2: Stocks de antibióticos utilizados

Antibiótico	Concentración stock	Preparación stock (disolvente)
Mupirocina (Sigma®)	10 mg/mL	50 mg de antibiótico en 5 mL de etanol
Ácido fuscídico (Sigma®)	10 mg/mL	50 mg de antibiótico en 5 mL de agua
Oxacilina (Sigma®)	10 mg/mL	50 mg de antibiótico en 5 mL de agua
Novobiocina (Sigma®)	10 mg/mL	50 mg de antibiótico en 5 mL de etanol
Rifampicina (Sigma®)	10 mg/mL	50 g de antibiótico en 5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO)

Una vez preparados los 5 mL de cada antibiótico, se alicuotearon en tubos Eppendorf, y se conservaron en un congelador a -20 °C para utilizarlos a lo largo del procedimiento.

3.5 Ensayos de conjugación mediante co-cultivo y selección de transconjugantes

Para estudiar la capacidad de transferencia de los plásmidos conjugativos portadores de la resistencia a mupirocina se realizaron experimentos cultivando conjuntamente las cepas bacterianas donadoras (portadoras del plásmido) y receptora (libre de plásmidos), y selección de transconjugantes, es decir, cepas receptoras que adquirieron el plásmido.

3.5.1 Conjugaciones en filtros de nitrocelulosa

Para realizar las conjugaciones se utilizaron filtros de nitrocelulosa de 0,22 µm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro ([Millipore GSWP](#)) como soporte sólido para las células. Se prepararon inóculos de las células receptoras y donadoras por separado en 10 mL de medio líquido LB con selección antibiótica y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C en agitación (100 rpm). En el caso de las receptoras se añadió rifampicina (2,5 µg/mL) y ácido fuscídico (5 µg/mL), mientras que para las donadoras se empleó mupirocina (10 µg/mL) y novobiocina (2,5 µg/mL) para la cepa NRS107, y mupirocina (10 µg/mL) y oxacilina (6 µg/mL) para las cepas HUNSC491 y HUNSC485

Para cada conjugación, se depositaron en Eppendorfs 100 µL de cada una de las cepas y se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm. Los sedimentos se resuspendieron con 1 mL de LB y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. Este paso de lavado se realiza para eliminar los restos de antibióticos que puedan interferir en el

crecimiento de las cepas. Tras la segunda centrifugación, las células se resuspendieron en 50 μL de LB, los cuales se depositaron sobre filtros colocados previamente sobre placas LB sin selección antibiótica. En general, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Además, se realizaron experimentos en las mismas condiciones, pero reduciendo el tiempo de contacto entre las células donadoras y receptoras, de 24 horas a 1 hora.

Tras dicha incubación, los filtros se colocaron en tubos de propileno de 15 mL a los que previamente se añadió 1 mL de medio LB. Los tubos se agitaron vigorosamente empleando un *vórtex* para favorecer que las células se desprendieran al medio líquido. A partir de esa solución, se realizaron diluciones seriadas en LB y cada una de ellas se sembró en placas con los correspondientes medios selectivos para las células donadoras y transconjugantes.

3.5.2 Selección de transconjugantes y donadoras

La selección de las células donadoras se realizó mediante la siembra de la mezcla conjugativa en placas de LB con mupirocina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y novobiocina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para la cepa NRS107; y mupirocina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y oxacilina (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para los aislados HUNSC491 y HUNSC485.

Por otro lado, la selección de las células transconjugantes (aquellas células receptoras que adquirieron los plásmidos durante el proceso de conjugación) se llevó a cabo sembrando las mezclas conjugativas en placas de LB con mupirocina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), rifampicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ácido fuscídico (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las placas se incubaron a 37°C *o/n*, tras lo cual se procedió al recuento de colonias.

3.5.3 Cálculo de la frecuencia de conjugación

Tras la incubación de las placas sembradas con las mezclas conjugativas, se contaron las colonias de donadoras (D) y transconjugantes (T) en las placas de LB agar. La estimación de la frecuencia de conjugación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$FC = \frac{T}{D} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias transconjugantes} \cdot \text{factor de dilución} \cdot \text{volumen sembrado}}{N^{\circ} \text{ colonias donadoras} \cdot \text{factor de dilución} \cdot \text{volumen sembrado}}$$

3.6 Estudio del efecto inhibitor de la conjugación

El compuesto químico evaluado fue cedido por el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-CSIC (IPNA-CSIC), y su estructura se representa en la [Figura 4](#).

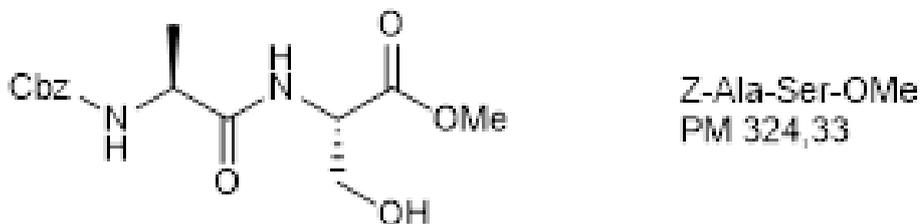


Figura 4: Estructura química del compuesto utilizado en el ensayo de conjugación

La evaluación preliminar de la posible actividad inhibitor de la conjugación se llevó a cabo según lo descrito en los apartados “[Conjugaciones en filtros de nitrocelulosa](#)”, “[Selección de transconjugantes y donadoras](#)” y “[Cálculo de la frecuencia de conjugación](#)”, con la particularidad de que los filtros con las mezclas conjugativas se depositaron en placas de LB a las que previamente se le añadió el compuesto ensayado a una concentración de 50 μ M. En el experimento se llevó a cabo, de forma paralela, la conjugación en placas de LB a las que no se añadió ningún compuesto químico como control.

4. Resultados y discusión

4.1 Puesta a punto del protocolo de conjugación

El primer objetivo consistió en la puesta a punto de un protocolo de conjugación para comprobar la capacidad conjugativa de plásmidos portadores de genes de resistencia y calcular las frecuencias de conjugación de los mismos.

Para ello se empleó la cepa donadora NRS107 portadora del plásmido conjugativo pGO400 y la cepa receptora libre de plásmidos WBG541. Inicialmente, para confirmar la presencia de los marcadores de selección antibiótica en cada caso, las cepas fueron crecidas en medio LB líquido con los antibióticos apropiados. Según lo esperado, la cepa NRS107 creció en presencia de mupirocina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y novobiocina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pero no con ácido fuscídico (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y rifampicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La cepa WBG541 no creció en presencia de mupirocina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o novobiocina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pero sí lo hizo en presencia de rifampicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ácido fuscídico (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En la [Figura 5](#) se muestra un ejemplo del crecimiento de las cepas NRS107 y WBG541 en ausencia o presencia de una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mupirocina.

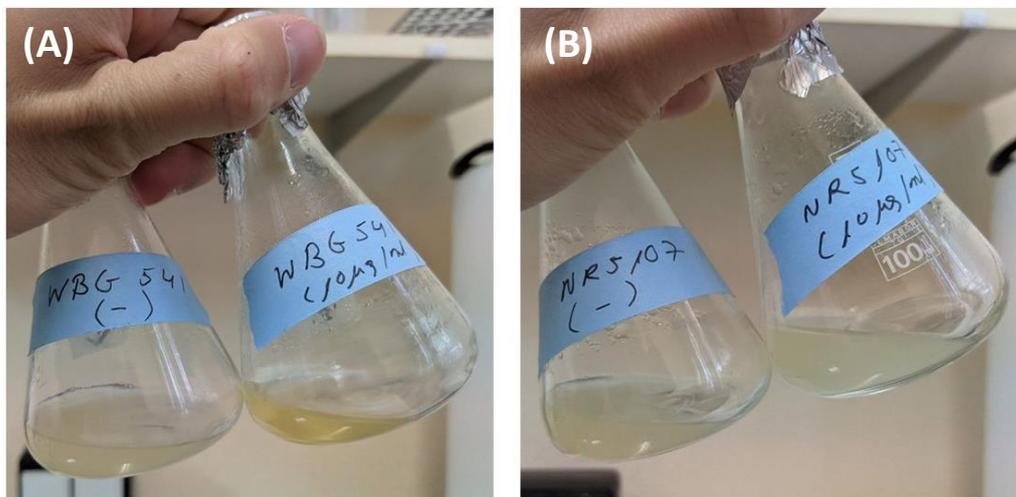


Figura 5: Ensayo para comprobación de los marcadores de resistencia de las cepas NRS107 y WBG541 a una concentración de mupirocina de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **(A)** Para la cepa WBG541 se observa turbidez en ausencia de antibiótico demostrando su crecimiento, mientras que no es observable en presencia de mupirocina. **(B)** Para la cepa NRS107 se observa turbidez tanto en presencia como en ausencia de mupirocina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, confirmando su crecimiento adecuado en presencia del antibiótico (Fotografía del autor)

Dado que las bacterias receptoras del plásmido de resistencia a mupirocina portan genes cromosómicos de resistencia a rifampicina y ácido fusídico, al combinar estos tres antibióticos en un medio de cultivo solo se podrán desarrollar las bacterias que, por

conjugación, reciben el plásmido de resistencia. Por otra parte, las bacterias donadoras del plásmido de resistencia a mupirocina portan un gen cromosómico de resistencia a novobiocina, de manera que en combinación con mupirocina en un medio de cultivo se permite su selección.

Seguidamente, tras realizar dichas comprobaciones, se realizó un experimento preliminar para comprobar la capacidad de transferencia conjugativa de la resistencia a altos niveles de mupirocina codificada en el plásmido pGO400 (cepa NRS107), la correcta selección antibiótica de cada una de las cepas en las placas con antibióticos, así como el rango de diluciones más apropiado para el recuento de colonias. Para ello se colocaron 3 filtros de nitrocelulosa en una placa de LB, la cual se preincubó a 37°C durante 30 minutos. Al primer filtro se le añadieron solo células donadoras (NRS107), al segundo se le añadieron células receptoras (WBG541) y al tercer filtro la mezcla 1:1 de células donadoras y receptoras ([Figura 6](#)). Una vez las células se adsorbieron a los filtros, la placa fue incubada a 37°C durante toda la noche, tras lo cual se procedió a realizar las diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) y la posterior extensión de cada una de ellas en placas de LB con selección antibiótica para las células transconjugantes (Mup, Rf y Fa). Adicionalmente, las diluciones a partir del filtro en el que se depositó la mezcla de células donadoras y receptoras se sembraron en placas de agar LB para con selección antibiótica para las células donadoras (Mup y Nv).

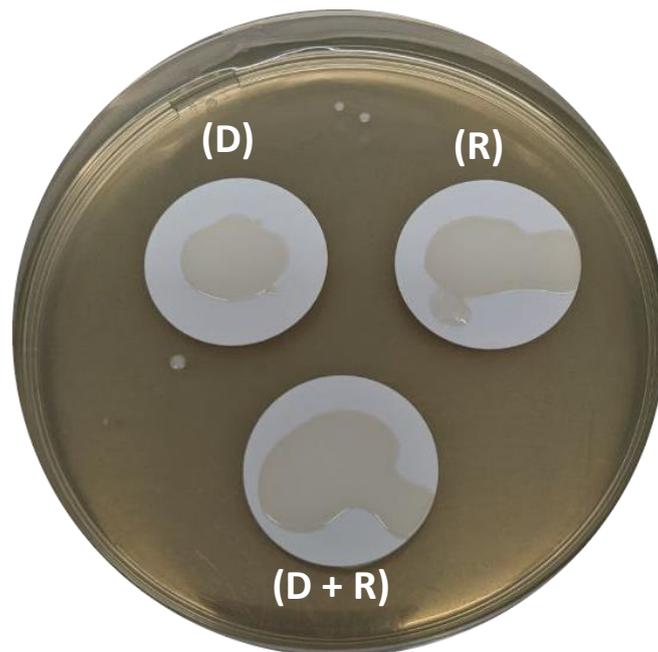


Figura 6: Disposición de los filtros de nitrocelulosa en los que se depositaron bacterias donadoras (D), receptoras (R) y la mezcla de ambas (D + R) para la conjugación (Fotografía del autor)

Tras la incubación durante toda la noche a 37°C, y según lo esperado, no se observó crecimiento en ninguna de las placas con Mup + Rf + Fa sembradas a partir de los filtros en los que únicamente se habían añadido células donadoras o receptoras. Las células donadoras no tienen resistencia a Rf y Fa, ni las receptoras a Mup, por lo que son incapaces de crecer cuando los tres antibióticos están presentes en el medio de cultivo. Sin embargo, sí se pudo observar crecimiento de colonias en las placas sembradas a partir de los filtros en los que se habían mezclado donadoras y receptoras, lo que demuestra que la resistencia a mupirocina se transfirió horizontalmente de las células donadoras a las receptoras, confirmando la capacidad conjugativa del pGO400, la cual había sido descrita en un estudio previo ([Morton et al., 1995](#)). En dicho trabajo las conjugaciones se llevaron a cabo filtrando las mezclas conjugativas a través de filtros de 0,45 µm de tamaño de poro, en lugar de depositarlas directamente sobre filtros de 0,22 µm como en el presente trabajo. Asimismo, a partir de las diluciones de los filtros que contenían donadoras y receptoras se obtuvo crecimiento en las placas con selección para las células donadoras (Mup + Nv).

En este experimento preliminar, en base al número de colonias que crecieron en cada una de las placas, se pudo determinar que las diluciones más adecuadas para el recuento de transconjugantes eran las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , mientras que para las células donadoras las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} . De esta manera, dichas diluciones fueron las que se decidieron sembrar en los siguientes experimentos de conjugación. Además, se pudo determinar una frecuencia de conjugación preliminar de $6,72 \times 10^{-4}$ transconjugantes/donadoras, algo superior que la frecuencia previamente descrita para dicho plásmido de entre 1×10^{-5} y 5×10^{-5} transconjugantes/donadoras (([Morton et al., 1995](#))). Tal como se describió en el apartado de “[Material y Métodos](#)”, la medida de la eficiencia de conjugación del plásmido pGO400 se realizó contabilizando el número de transconjugantes (T) que se obtienen cuando se pone en contacto una población de donadoras NRS107 (D) con una población de receptoras WBG541, durante un tiempo t . Para el cálculo de la frecuencia de conjugación se utilizó la dilución 10^{-3} para el recuento de transconjugantes y 10^{-6} para el recuento de donadoras del plásmido de resistencia. En la [Tabla 3](#) se muestran los recuentos obtenidos en este experimento preliminar.

Tabla 3: Recuento de colonias para la conjugación preliminar entre las cepas NRS107 y WBG541

Dilución	NRS107/WBG541 A	
	Donadoras	Transconjugantes
10^{-5}	>300	10^{-2} >300
10^{-6}	183	10^{-3} 123
10^{-7}	19	10^{-4} 13
10^{-8}	0	10^{-5} 0
Tasa de conjugación	$6,72 \times 10^{-4}$	

4.2 Frecuencia de conjugación del plásmido pGO400

Una vez se comprobó la capacidad de transferencia horizontal del plásmido pGO400 y se obtuvo un primer valor de la frecuencia de conjugación en las condiciones indicadas, se realizaron experimentos empleando las mismas cepas para comprobar la reproducibilidad de los valores de la frecuencia de conjugación del pGO400. Para ello se repitió el ensayo por triplicado para obtener valores medios de la frecuencia de conjugación. En esta ocasión también se emplearon 3 filtros, pero a cada uno de ellos se les añadió la mezcla de donadoras + receptoras (1:1).

En la [Tabla 4](#) se presentan los resultados obtenidos en dichos experimentos. Para calcular las frecuencias de conjugación se utilizaron en todos los casos las diluciones 10^{-2} en el caso de las placas Mup+Rf+Fa para el recuento de transconjugantes, y las diluciones 10^{-6} en las placas Mup+Nv para el recuento de donadoras del plásmido de resistencia ([Figura 7](#)). Las frecuencias de conjugación obtenidas fueron desde $4,83 \times 10^{-4}$ hasta $5,94 \times 10^{-5}$, dando un valor medio de $5,12 \times 10^{-4} \pm 4,68 \times 10^{-4}$ transconjugantes/donadoras. Aunque este valor es próximo al obtenido en el experimento preliminar, la desviación entre las réplicas sugiere que las condiciones experimentales se deben ajustar para obtener valores de frecuencias más similares. Es conveniente realizar nuevos experimentos siguiendo el protocolo explicado para esta misma cepa, con el fin de comprobar la fiabilidad de los resultados obtenidos en este trabajo.

Tabla 4: Recuento de colonias en el experimento de conjugación por triplicado entre las cepas NRS107 y WBG541. Donadoras (D) y transconjugantes (T)

Dilución	NRS107/WBG541 réplica 'A'				NRS107/WBG541 réplica 'B'				NRS107/WBG541 réplica 'C'					
	D		T		D		T		D		T			
10^{-6}	232		10^{-3}	112	10^{-6}	202		10^{-3}	12	10^{-6}	179		10^{-3}	178
10^{-7}	19		10^{-4}	14	10^{-7}	27		10^{-4}	2	10^{-7}	15		10^{-4}	11
Tasa de conjugación	$4,83 \times 10^{-4}$				$5,94 \times 10^{-5}$				$9,94 \times 10^{-4}$					
Tasa de conjugación media										$5,12 \times 10^{-4} \pm 4,68 \times 10^{-4}$				

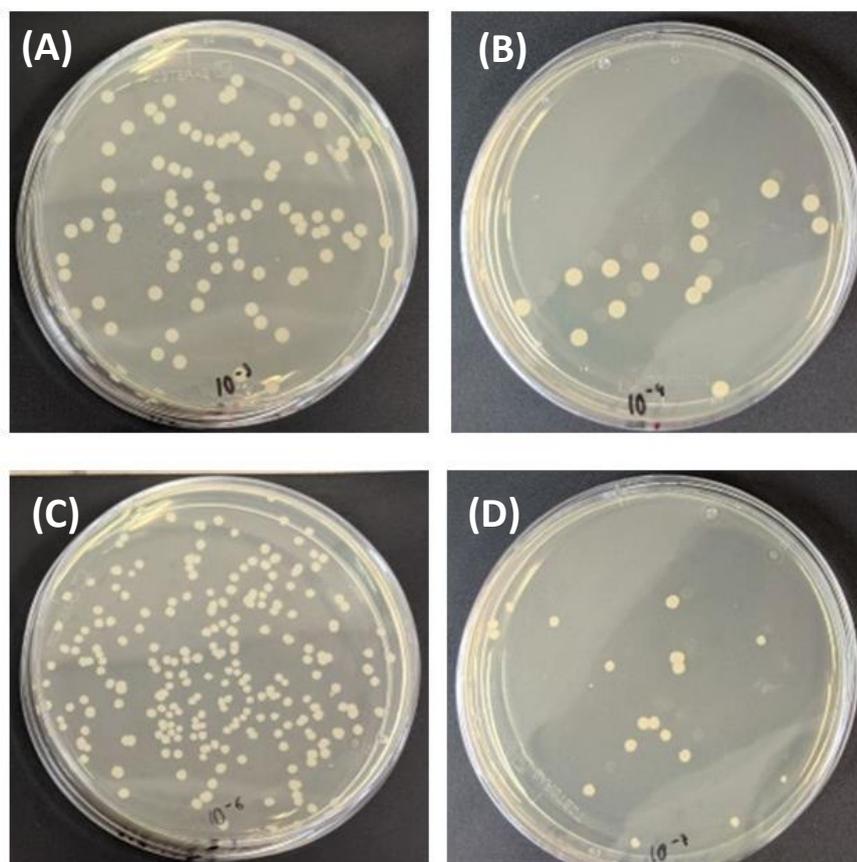


Figura 7: Placas de cultivo para el recuento de colonias de bacterias transconjugantes (A) dilución 10^{-3} y (B) dilución 10^{-4} ; y donadoras (C) dilución 10^{-6} y (D) dilución 10^{-7} del plásmido de resistencia pGO400 en la réplica 'A' entre las cepas NRS107 (donadoras) y WBG541 (receptoras). Se observa concordancia entre diluciones, manteniendo una relación de 10 veces menos cantidad de unidades formadoras de colonias entre diluciones sucesivas. (Fotografía del autor)

4.2.1 Estudio del efecto del tiempo de conjugación

Con el fin de comprobar si la transferencia de la resistencia a mupirocina codificada en el plásmido pGO400 tendría lugar reduciendo el tiempo de conjugación, se repitió el experimento por duplicado realizando incubaciones de 1 hora en lugar de toda la noche,

tal como se indicó en el apartado de “[Material y Métodos](#)”. Con este objetivo, y tal como se muestra en la [Tabla 5](#), no se obtuvo crecimiento de transconjugantes en las siembras de las diluciones realizadas a partir de las mezclas conjugativas depositadas en ninguno de los filtros. Este resultado sugiere que no es suficiente el tiempo de incubación de 1 hora para que tenga lugar la transferencia del pGO400 entre las células donadoras y receptoras, al menos a la frecuencia observada cuando se incuban las mezclas conjugativas durante 24 horas. Este resultado concuerda con la mayor parte de estudios previos en los que, generalmente, emplean tiempos de incubación de 18-24 h para comprobar la transferencia de resistencias a los antibióticos a partir de cepas de *S. aureus* ([Udo et al., 1997](#); [Udo et al., 1998](#); [Liu et al., 2013](#)).

Tabla 5: Recuento de colonias para la conjugación entre las cepas NRS107 y WBG541 que permaneció 1 hora en incubación

Dilución	NRSA107/WBG541 réplica 'A'				NRSA107/WBG541 réplica 'B'			
	Donadoras		Transconjugantes		Donadoras		Transconjugantes	
10^{-6}	17	10^{-3}	0	10^{-6}	42	10^{-3}	0	
10^{-7}	1	10^{-4}	0	10^{-7}	4	10^{-4}	0	
Tasa de conjugación	0			0				
Tasa de conjugación media	0							

Con el objetivo de encontrar el tiempo mínimo necesario para que se produzca la conjugación del plásmido pGO400 empleando el sistema descrito en este trabajo y con frecuencias similares a las observadas en las incubaciones durante 18-24 horas, es necesario repetir los experimentos variando los tiempos de incubación. La obtención de resultados reproducibles empleando menores tiempos de incubación, permitiría disponer de un sistema más adecuado para estudiar de manera rápida la transferencia horizontal de resistencias a los antibióticos.

4.2.2 Estudio del efecto del inhibidor de la conjugación

Finalmente, en los filtros que fueron incubados en medios de cultivo que contienen un compuesto candidato para la inhibición de la conjugación el número de colonias observadas se muestra en la [Tabla 6](#).

Tabla 6: Recuento de colonias para la conjugación entre las cepas NRS107 y WBG541 en presencia de un compuesto candidato para la inhibición de la conjugación

Dilución	NRSA107/WBG541 inhibidor, réplica 'A'				NRSA107/WBG541 inhibidor, réplica 'B'				NRSA107/WBG541 inhibidor, control -			
	D		T		D		T		D		T	
10^{-6}	174	10^{-3}	49	10^{-6}	109	10^{-3}	36	10^{-6}	243	10^{-3}	135	
10^{-7}	13	10^{-4}	5	10^{-7}	11	10^{-4}	3	10^{-7}	11	10^{-4}	10	
Tasa de conjugación	2,82×10 ⁻⁴				3,3×10 ⁻⁵				5,55×10 ⁻⁴			
Tasa de conjugación media					3,06×10 ⁻⁴ ± 3,41×10 ⁻⁵							

Para el cálculo de la tasa de conjugación se utilizaron las diluciones 10^{-6} para el recuento de colonias donadoras, y las diluciones 10^{-3} para las receptoras del plásmido de resistencia. Si bien el número de colonias de transconjugantes es mucho menor en ambos experimentos con el péptido candidato inhibidor de la conjugación, la tasa de conjugación media sigue encontrándose dentro de un orden de magnitud normal para el plásmido pGO400 ([Morton et al., 1995](#)). Para poder confirmar que el protocolo desarrollado en este trabajo permite detectar la modificación en la tasa de conjugación de los plásmidos de resistencia a antibióticos, se recomienda realizar nuevos experimentos con otros potenciales compuestos inhibidores hasta lograr resultados esperados.

4.3 Estudio de otros plásmidos portadores del gen *ileS2*: plásmido pPR9 y pPR2

El sistema de conjugación descrito se utilizó para comprobar la capacidad conjugativa y calcular la frecuencia de conjugación preliminar de otros plásmidos que codifican resistencia a mupirocina presentes en diferentes cepas. Para ello, se llevó a cabo el experimento de conjugación empleando como donador el aislado clínico HUNSC491, el cual es portador del plásmido pPR9 (41,7 kb) ([Pérez-Roth et al., 2006](#)) y la cepa receptora WBG541. En este caso, y al igual que se hizo cuando se realizó el experimento preliminar, inicialmente las cepas se crecieron en presencia/ausencia de los diferentes antibióticos para confirmar los marcadores de selección correspondientes. Así, la cepa HUNSC491, creció correctamente en cultivos independientes en presencia de mupirocina (10 µg/mL) y oxacilina (6 µg/mL), respectivamente. La oxacilina es el marcador utilizado para

el recuento de células donadoras en este caso, ya que la cepa HUNSC491 es un SARM. Según lo esperado, la cepa receptora WBG541 fue incapaz de crecer con 6 µg/mL de oxacilina.

Al igual que en las conjugaciones entre las cepas NRS107 y WBG541, en este caso se obtuvieron células transconjugantes, confirmando la capacidad de transferencia del plásmido pPR9. Aunque únicamente realizó una réplica, se calculó la frecuencia de conjugación preliminar de dicho plásmido. Para ello se utilizó la dilución 10^{-6} para el recuento de donadoras y la 10^{-2} para el recuento de transconjugantes, dando como resultado una frecuencia de conjugación de $3,87 \times 10^{-7}$ transconjugantes/donadoras. Dicha tasa de conjugación es próxima a los valores obtenidos previamente para dicho plásmido, entre 5×10^{-6} y 1×10^{-7} transconjugantes/donadoras ([Pérez-Roth et al., 2010](#)). De cualquier manera, para obtener valores más fiables de la frecuencia de conjugación es necesario repetir los experimentos incluyendo réplicas que permitan obtener los valores medios y el error y trabajar con resultados más robustos. En la [Tabla 7](#) se muestran los resultados.

Tabla 7: Recuento de colonias para la conjugación entre el aislado clínico SARM HUNSC491 y la cepa WBG541

Dilución	HUNSC491/WBG541	
	Donadoras	Transconjugantes
10^{-5}	>300	10^{-2} 86
10^{-6}	222	10^{-3} 4
10^{-7}	42	10^{-4} 1
10^{-8}	3	10^{-5} 0
Tasa de conjugación	$3,87 \times 10^{-7}$	

Además, en este experimento entre HUNSC491 y WBG541, se pudo observar que tanto las colonias transconjugantes como las donadoras, requerían varios días (no 24 horas como en el caso de las conjugaciones entre NRS107 y WBG541) para crecer y poder llevar a cabo los recuentos. De esta manera, los recuentos se realizaron a las 72 horas. Este hecho concuerda con observaciones previas que habían puesto de manifiesto una fase de latencia significativamente incrementada en las cepas portadoras del pPR9 en presencia de mupirocina, incluso a bajas concentraciones

([Pérez-Roth et al., 2006](#)). Esto podría ser debido a menores niveles de expresión del gen *ileS2* presente en el plásmido pPR9 en relación con el pGO400. Aunque esta hipótesis no ha sido demostrada, se ha predicho que el promotor del gen *ileS2* del plásmido pGO400 presenta una secuencia más óptima que la del pPR9, y que esto se relaciona con la diferente ubicación de las secuencias de inserción 257 (IS257) en dichos plásmidos

Finalmente, el protocolo de conjugación se utilizó para comprobar la capacidad de transferencia horizontal de la resistencia a mupirocina a partir de aislados clínicos resistentes a altos niveles de mupirocina previamente caracterizados, portadores del gen *ileS2* en diferentes plásmidos conjugativos que no han sido completamente caracterizados, a diferencia de los plásmidos pPR9 y pGO400 de los que se conoce la secuencia nucleotídica completa. Por ejemplo, se conjugó el aislado HUNSC485, portador del plásmido pPR2 con la cepa receptora WBG541. De nuevo, se siguió el protocolo explicado en el experimento preliminar para la confirmación de la presencia de los marcadores de selección, creciendo favorablemente en cultivos en medio líquido independientes en presencia de mupirocina (10 µg/mL) y oxacilina (6 µg/mL).

En la [Tabla 8](#) se muestran los resultados del experimento. Los resultados de la conjugación volvieron a ser favorables, pues se obtuvieron células transconjugantes confirmando así la capacidad de transferencia del plásmido pPR2. Con estos valores, se calculó la frecuencia de conjugación preliminar del plásmido, utilizando la dilución 10^{-5} para el recuento de donadoras, y 10^{-3} para el recuento de transconjugantes, dando como resultado una frecuencia de conjugación de $1,07 \times 10^{-2}$ transconjugantes/donadoras. Esta frecuencia de conjugación, al igual que la obtenida para el plásmido pPR9, es superior a la descrita generalmente para plásmidos conjugativos de la familia de los plásmidos pSK41/pGO1 ([Liu et al., 2013](#)). De nuevo, para la obtención de valores fiables de la frecuencia de conjugación es necesario repetir este experimento incluyendo réplicas para la obtención de un valor medio y un error.

Tabla 8: Recuento de colonias para la conjugación entre el aislado clínico HUNSC485 y la cepa WBG541

Dilución	HUNSC485/WBG541	
	Donadoras	Transconjugantes
	10^{-5} 115	10^{-2} >300
	10^{-6} 12	10^{-3} 124
	10^{-7} 0	10^{-4} 3
	10^{-8} 0	10^{-5} 0
Tasa de conjugación		$1,07 \times 10^{-2}$

En este experimento entre las cepas HUNSC485 y WBG541 el crecimiento de las colonias de transconjugantes y donadoras fue adecuado para poder realizar los recuentos a las 24 horas tras la mezcla sobre el filtro de nitrocelulosa.

5. Conclusiones

1. Se ha puesto a punto un protocolo de conjugación *in vitro* que permitió confirmar la capacidad de transferencia horizontal de diferentes plásmidos portadores del gen *ileS2* que codifica resistencia a altos niveles de mupirocina
2. El protocolo de conjugación posibilitó el cálculo de las frecuencias de conjugación los plásmidos pGO400, pPR9 y pPR2. La determinación fiable de las mismas requiere repetir los ensayos ajustando las condiciones experimentales.
3. Es necesario un tiempo de incubación superior a 1 hora para obtener transconjugantes portadores del plásmido pGO400. Son necesarios experimentos adicionales para determinar el tiempo mínimo requerido para obtener valores máximos y reproducibles de la frecuencia de conjugación.
4. El compuesto dipéptido estudiado no dio lugar a una reducción significativa de la frecuencia de conjugación del plásmido pGO400.
5. Para conocer el rango de aplicabilidad del protocolo descrito es necesario utilizarlo para estudiar la capacidad de transferencia de diferentes plásmidos de resistencia a antibióticos e incluso en diferentes especies bacterianas.

6. Conclusions

1. An in vitro conjugation protocol has been developed to confirm the horizontal transfer capacity of different plasmids carrying the *ileS2* gene encoding high-level mupirocin resistance.
2. The conjugation protocol made it possible to calculate the conjugation frequencies of plasmids pGO400, pPR9 and pPR2. Reliable determination of these frequencies requires tests adjusting the experimental conditions.
3. Incubation time longer than 1 hour is necessary to obtain transconjugants carrying plasmid pGO400. Further experiments are required to determine the minimum time necessary to obtain maximum and reproducible values of the conjugation frequency.
4. The dipeptide compound studied did not result in a significant reduction in the conjugation frequency of plasmid pGO400.
5. To know the range of applicability of the described protocol it is necessary to use it to study the transfer capacity of different antibiotic resistance plasmids and even in different bacterial species.

7. Referencias

- Alemán, M. G. (2013). Resistencia antimicrobiana, una amenaza mundial. *Revista Cubana de Pediatría*, 85(4), 414–417.
- Center for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). doi:10.15620/cdc:82532
- Frost, L. S. (2009). Conjugation, bacterial. *Encyclopedia of microbiology* (pp. 517-531) Elsevier. doi:10.1016/B978-012373944-5.00007-9
- Gillaspy, A. F., & Iandolo, J. J. (2009). Staphylococcus. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of microbiology (third edition)* (pp. 293-303). Oxford: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00237-6>Harris,
- Grumezescu, V., Holban, A. M., Barbu, I., Popescu, R. C., Oprea, A. E., Lazar, V., et al. (2016). Nanoarchitectonics used in antiinfective therapy. *Antibiotic resistance* (pp. 145-166) Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-803642-6.00007-1
- Harris, L. G., Foster, S. J., & Richards, R. G. (2002). An introduction to staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying s. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, 4, 39-60. doi:10.22203/eCM.v004a04
- Huisman, J. S., Benz, F., Duxbury, S. J. N., de Visser, J. Arjan G.M, Hall, A. R., Fischer, E. A. J., et al. (2022). Estimating plasmid conjugation rates: A new computational tool and a critical comparison of methods. *Plasmid*, 121, 102627. doi:10.1016/j.plasmid.2022.102627
- Kizerwetter-Świda, M., Chrobak-Chmiel, D. & Rzewuska, M. High-level mupirocin resistance in methicillin-resistant staphylococci isolated from dogs and cats. *BMC Vet Res* 15, 238 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1973-y>
- Liu, M. A., Kwong, S. M., Jensen, S. O., Brzoska, A. J., & Firth, N. (2013). Biology of the staphylococcal conjugative multiresistance plasmid pSK41. *Plasmid*, 70(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.02.001>
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33-39. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- Morton, T. M., Johnston, J. L., Patterson, J., & Archer, G. L. (1995). Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1272-1280. doi:10.1128/AAC.39.6.1272

- Pérez-Roth, E., Armas-González, E., Alcoba-Flórez, J., & Méndez-Álvarez, S. (2011). PCR-based amplification of heterogeneous IS257-ileS2 junctions for molecular monitoring of high-level mupirocin resistance in staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(3), 471-475. doi:10.1093/jac/dkq493
- Pérez-Roth, E., Kwong, S. M., Alcoba-Flórez, J., Firth, N., & Méndez-Álvarez, S. (2010). Complete nucleotide sequence and comparative analysis of pPR9, a 41.7-kilobase conjugative staphylococcal multiresistance plasmid conferring high-level mupirocin resistance *American Society for Microbiology*. doi:10.1128/aac.01074-09
- Pérez-Roth, E., López-Aguilar, C., Alcoba-Flórez, J., & Méndez-Álvarez, S. (2006). High-level mupirocin resistance within methicillin-resistant staphylococcus aureus pandemic lineages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(9), 3207-3211. doi:10.1128/AAC.00059-06
- Piddock L. J. (2012). The crisis of no new antibiotics--what is the way forward? *The Lancet. Infectious diseases*, *12*(3), 249–253. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70316-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70316-4)
- Raleigh, E. A., & Low, K. B. (2013). Conjugation. *Brenner's encyclopedia of genetics* (Second Edition ed., pp. 144-151) Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00321-1
- Simonsen, L., Gordon, D. M., Stewart, F. M., & Levin, B. R. (1990). Estimating the rate of plasmid transfer: An end-point method. *Journal of General Microbiology*, *136*(11), 2319-2325. doi:10.1099/00221287-136-11-2319
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 47. doi:10.3389/fmicb.2013.00047
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 434-452. doi:10.1128/MMBR.00020-10
- Udo, E. E., & Jacob, L. E. (1998). Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance and the mobilization of non-conjugative plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, *4*(3), 185–193. <https://doi.org/10.1089/mdr.1998.4.185>
- Udo, E. E., Jacob, L. E., & Mokadas, E. M. (1997). Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus haemolyticus* to other staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *41*(3), 693–695. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.693>

- Ventola C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277–283.
- Ward, A., & Richards, D. M. (1985). Mupirocin: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties, and therapeutic use. *Drugs (New York, N.Y.)*, 30(5), 382-426. doi:10.2165/00003495-198530050-00002