



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de una herramienta de cultivo continuo para la generación de mutantes inducidos por exposición a agentes antibacterianos

Karen Nijireth Romero Umaña

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2021- II

Desarrollo de una herramienta de cultivo continuo para la generación de mutantes inducidos por exposición a agentes antibacterianos

Karen Nijireth Romero Umaña

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias- Farmacología

Director (a):

Q.F. M.Sc. Edelberto Silva Gómez

Línea de Investigación:

Farmacología

Grupo de Investigación:

GREICAH- Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas en Cáncer y Alteraciones Hematológicas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2021-II

A mis padres y hermana

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Karen Nijireth Romero Umaña

Nombre

01/03/2022

Fecha

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por su acompañamiento, apoyo, paciencia y confianza. Gracias a la Universidad Nacional de Colombia y especialmente a mi director de tesis, el profesor Edelberto Silva Gómez, por su orientación, asesoría y dedicación, por generar en mí el deseo constante de siempre avanzar y el amor hacia la investigación. Finalmente me siento agradecida por vivir esta experiencia tan enriquecedora y gratificante para mi crecimiento personal y profesional y a todos aquellos que han aportado en este proceso.

Resumen

Desarrollo de una herramienta de cultivo continuo para la generación de mutantes inducidos por exposición a agentes antibacterianos

Se estableció un cultivo continuo operado al 50% de la velocidad específica de crecimiento ($\mu = 0,2587 \text{ h}^{-1}$ para *E. coli*; $\mu = 0,2695 \text{ h}^{-1}$ para *S. aureus*), una vez estabilizado el crecimiento se adicionó Piperacilina/ Tazobactam a una concentración equivalente al 50% de la MIC hasta alcanzar la estabilidad de crecimiento. Luego, se aumentó la concentración de Piperacilina/ Tazobactam a 75% de la MIC hasta estabilidad y finalmente se incrementó hasta 1MIC. Con la herramienta propuesta, se logró la generación de microorganismos mutantes, resistentes a Piperacilina/ Tazobactam (32 veces más resistentes tanto para *E. coli* como para *S. aureus*), con el cultivo continuo en funcionamiento por aproximadamente 55 horas, de las cuales más o menos 40 horas correspondieron a exposición antibiótica, lo que es un tiempo relativamente corto y requiriendo un gasto bajo de material (caldo de cultivo gastado por hora) con una alta producción de biomasa (microorganismos resistentes a Piperacilina/ Tazobactam).

Palabras clave: Desarrollo de resistencia, piperacilina/tazobactam, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, resistencia antibiótica, cultivo continuo.

Abstract

Development of a continuous culture tool for the generation of mutants induced by exposure to antibacterial agents.

A continuous culture operated at 50% of the specific growth rate ($\mu = 0,2587 \text{ h}^{-1}$ for *E. coli*; $\mu = 0,2695 \text{ h}^{-1}$ for *S. aureus*) was established. Once growth had stabilized, Piperacillin/Tazobactam was added to a concentration equivalent to 50% of the MIC until growth stability is reached. Piperacillin/Tazobactam concentration was then increased to 75% of the MIC until stable and finally increased to 1MIC. With the proposed tool, the generation of mutant microorganisms resistant to Piperacillin/Tazobactam (32 times more resistant to both *E. coli* and *S. aureus*) was achieved, with continuous culture in operation for approximately 55 hours, of which more or less 40 hours corresponded to antibiotic exposure, which is a relatively short time and requires a low expenditure of material (culture broth spent per hour) with a high production of biomass (Piperacillin/Tazobactam resistant microorganisms).

Palabras clave: Antibiotic resistant, *Escherichia coli*, piperacillina/tazobactam, resistance development, *Staphylococcus aureus*, continuous culture.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XV
Introducción	1
Objetivos.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos.....	4
Consideraciones éticas, legales y ambientales	5
1. Marco Teórico.....	7
1.1 Generación de resistencia a los antibióticos.....	7
1.2 Mecanismos de acción de los antibióticos.....	10
1.2.1 Inhibidores de la síntesis de pared.....	10
1.2.2 Activos en la membrana citoplasmática	10
1.2.3 Inhibidores de la síntesis proteica	11
1.2.4 Activos en el metabolismo o síntesis de los ácidos nucleicos	11
1.2.5 Bloqueadores de la síntesis de factores metabólicos.....	12
1.3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos	12
1.4 Piperacilina/ Tazobactam	13
1.5 Cultivo continuo.....	14
2. Materiales & Métodos.....	16
2.1 Microorganismos.....	16
2.2 Medios de cultivo y reactivos.....	16
2.2.1 Medios de cultivo	16
2.2.2 Reactivos.....	16
2.3 Materiales y Equipos	16
2.3.1 Materiales e instrumental de laboratorio	16
2.3.2 Equipos	17
2.4 Preparación del inóculo.....	18
2.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	18
2.6 Evaluación de la Cinética de Crecimiento	22

2.6.1	Matraz	22
2.6.2	Reactor	22
2.7	Desarrollo del Cultivo Continuo	23
2.8	Evaluación de la resistencia en medio sólido	25
2.9	Evaluación del perfil de resistencia	25
3.	Resultados.....	27
3.1	Determinación previa de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	27
3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	27
3.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.2	Evaluación de la Cinética de Crecimiento	29
3.2.1	Matraz	29
3.2.1.1	<i>Escherichia coli</i>	29
3.2.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.2.2	Reactor	30
3.2.2.1	<i>Escherichia coli</i>	30
3.2.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.3	Desarrollo del Cultivo Continuo	31
3.3.1	<i>Escherichia coli</i>	33
3.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	36
3.4	Evaluación del perfil de resistencia	39
3.4.1	<i>Escherichia coli</i>	40
3.4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	40
4.	Discusión.....	41
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	47
5.1	Conclusiones.....	47
5.2	Recomendaciones.....	47
	A. Anexo: Evaluación de la MIC de las muestras de cultivo continuo de <i>Escherichia coli</i>.....	49
	B. Anexo: Evaluación de la MIC de las muestras de cultivo continuo de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
	Bibliografía	59

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Resumen esquemático de los tipos de resistencia antibacteriana según su forma de generación.....	9
Figura 2-1: Dilución seriada. Determinación de la MIC en medio líquido.	19
Figura 2-2: Esquema total determinación de la MIC en tubos.....	20
Figura 2-3: Ejemplo crecimiento en determinación de la MIC en tubos.....	20
Figura 2-4: Ejemplo crecimiento en determinación de la MIC, siembra en agar.....	21
Figura 2-5: Reactor, funcionamiento en lote.	23
Figura 2-6: Reactor, funcionamiento en cultivo continuo.....	24
Figura 2-7: Esquema determinación de la MIC en placa de 96 pozos.....	26
Figura 3-1: Resultado crecimiento determinación previa MIC tubos. <i>E. coli</i>	27
Figura 3-2: Resultado crecimiento determinación previa MIC tubos. <i>S. aureus</i>	28
Figura 3-3: Curvas de crecimiento <i>E. coli</i>	29
Figura 3-4: Curvas de crecimiento <i>S. aureus</i>	30
Figura 3-5: Cinética de crecimiento en reactor. <i>E. coli</i>	30
Figura 3-6: Cinética de crecimiento en reactor. <i>S. aureus</i>	31
Figura 3-7: Partes del reactor.	32
Figura 3-8: Cambio en el crecimiento del cultivo continuo 1. <i>E. coli</i>	33
Figura 3-9: Cambio en el crecimiento del cultivo continuo 2. <i>E. coli</i>	34
Figura 3-10: Cambios en la MIC de las muestras de <i>E. coli</i>	35
Figura 3-11: MIC en medio sólido. Cultivo continuo 1. <i>E. coli</i>	35
Figura 3-12: MIC en medio sólido. Cultivo continuo 2. <i>E. coli</i>	36
Figura 3-13: Cambio en el crecimiento del cultivo continuo 1. <i>S. aureus</i>	36
Figura 3-14: Cambio en el crecimiento del cultivo continuo 2. <i>S. aureus</i>	37
Figura 3-15: Cambios en la MIC de las muestras de <i>S. aureus</i>	38
Figura 3-16: MIC en medio sólido. Cultivo continuo 1. <i>S. aureus</i>	38
Figura 3-17: MIC en medio sólido. Cultivo continuo 2. <i>S. aureus</i>	39

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3-1: Resumen datos de la MIC para los ensayos realizados para <i>E. coli</i>	28
Tabla 3-2: Resumen datos de la MIC para los ensayos realizados para <i>S. aureus</i>	29
Tabla 3-3: MIC frente a varios antibióticos. <i>E. coli</i>	40
Tabla 3-4: MIC frente a varios antibióticos. <i>S. aureus</i>	40
Tabla 4-1: MIC antibióticos evaluados (CLSI, 2020; Schumacher et al., 2007).	44
Tabla 5-1: MIC en medio líquido medida en muestras de cultivo continuo 1.	49
Tabla 5-2: MIC en medio líquido (concentración modificada) medida en muestras de cultivo continuo 1.....	50
Tabla 5-3: Valoración de la resistencia en medio sólido de muestras de cultivo continuo 1.	51
Tabla 5-4: MIC en medio líquido medida en muestras de cultivo continuo 2.	52
Tabla 5-5: MIC en medio líquido (concentración modificada) medida en muestras de cultivo continuo 2.....	53
Tabla 5-6: Valoración de la resistencia en medio sólido de muestras de cultivo continuo 2.	53
Tabla 5-7: MIC en medio líquido medida en muestras de cultivo continuo 1.	55
Tabla 5-8: Valoración de la resistencia en medio sólido de muestras de cultivo continuo 1.	56
Tabla 5-9: MIC en medio líquido medida en muestras de cultivo continuo 2.	57
Tabla 5-10: Valoración de la resistencia en medio sólido de muestras de cultivo continuo 2.....	58

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término	Definición
A	Absorbancia	$\text{Log} \frac{1}{T}$
μ	Velocidad específica de crecimiento	Capítulo 3 (Sección 3.3) Capítulo 4
t_d	Tiempo de duplicación	Capítulo 1 (Sección 1.5)

Superíndices

Símbolo	Término
TM	Trade Mark
®	Marca Registrada

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	The Clinical & Laboratory Standards Institute
INS	Instituto Nacional de Salud
MH	Mueller Hinton
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	Proteínas Fijadoras de Penicilina
UCI	Unidad de Cuidado Intensivo
UFC	Unidad Formadora de Colonia
USP	United States Pharmacopeia

Introducción

La resistencia antibiótica se ha convertido en un problema de salud pública que afecta actualmente gran parte del planeta (OMS, 2020a, 2020b). Según datos publicados por la OMS en 2020, algunas infecciones graves que antes eran de tratamiento rutinario, con altos márgenes de efectividad, como por ejemplo, las causadas por *Staphylococcus aureus*, ahora son con mucha frecuencia resistentes a tratamientos antibióticos de primera línea, lo que lleva a un aumento de hasta el 64% en la probabilidad de morir en comparación con el tratamiento de infecciones no resistentes (OMS, 2020b).

En 2018 la OMS publicó el informe del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia y el Uso de los Antibióticos (GLASS) (World Health Organization (OMS, 2020c), el cual fue creado con la intención de dar seguimiento a la aparición y situación actual en relación con casos de resistencia a los fármacos antimicrobianos que se usan para el tratamiento de las diversas infecciones causadas por microorganismos, donde informó que actualmente hay 64.000 sitios de vigilancia y más de 2 millones de pacientes reclutados en 66 países de todo el mundo (OMS, 2020c).

El uso masivo de antibióticos ha acelerado la generación de resistencias frente a los tratamientos antibióticos actuales (OMS, 2016, 2020a, 2020b; Oromí Durich, 2000), por lo que, el desarrollo de técnicas útiles en el estudio de la resistencia antibiótica es de gran importancia permitiendo obtener valiosas herramientas con las que se pueda hacer seguimiento para enfrentar con mayor información el gran problema que se viene presentando con los microorganismos que cohabitan el planeta junto al ser humano.

La resistencia a antibióticos se considera parte de la evolución natural que presentan los microorganismos ante el entorno en función de su respuesta adaptativa (Barrantes Jiménez et al., 2022; Oromí Durich, 2000). La resistencia se da cuando el microorganismo desarrolla herramientas o estrategias que evitan que la exposición al agente antimicrobiano (fármacos, desinfectantes, antisépticos, etc.) lo afecte, y de esta

manera puede crecer aún en presencia de dicho agente (OMS, 2016, 2020c). Es decir, los microorganismos pueden desarrollar resistencia a los antibióticos que se puede dividir en dos tipos: la resistencia natural o intrínseca y la resistencia adquirida (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Oromí Durich, 2000; Quiñonez Pérez, 2017; Tortora et al., 2007). Encontrando en la resistencia adquirida, las mutaciones, y es con base en este mecanismo que se fundamentó la propuesta a desarrollada con este trabajo de investigación, ya que las mutaciones, se han plantearon como el mecanismo de inducción de resistencias en el medio de cultivo que se propone en este documento, por lo que se define como bacteria mutante a aquella que genere un cambio en la concentración mínima inhibitoria frente al antibiótico evaluado, pasando de ser sensible a ser resistente (Cabrera et al., 2007; Celis Bustos et al., 2017; Fernández Riverón et al., 2003; Galán et al. 2006; OMS, 2020a).

No obstante, aunque esta es una respuesta natural, el uso masivo de antimicrobianos ha acelerado este fenómeno llevando a tasas de mutación que superan, por mucho, el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, lo que se ha convertido en un problema de salud pública en el mundo, debido a las crecientes cifras de infecciones secundarias a microorganismos multiresistentes a los tratamientos que se encuentran disponibles en el mercado y sumando a esto, la dificultad que se presenta en los tiempos requeridos para la investigación y desarrollo de nuevas moléculas, por parte de la industria farmacéutica y los centros de investigación (Moreno et al., 2009; Oromí Durich, 2000).

En este trabajo se evaluó el antibiótico Piperacilina/ Tazobactam, el cual está compuesto por dos moléculas: la piperacilina que es un antibiótico betalactámico, que bloquea la transpeptidación en la síntesis de peptidoglicano en la pared celular de la bacteria y el tazobactam que es un inhibidor de β -lactamasas (Abdelraouf et al., 2020). Teniendo en cuenta el grave y creciente problema que representa la resistencia a los antibióticos y el comportamiento en cuanto a consumo y resistencias inducidas por Piperacilina/ Tazobactam, se hace necesario el desarrollo técnicas que permita la evaluación del impacto de la exposición de microorganismos sensibles a este antibiótico para evaluar su capacidad de generación de resistencias, con el fin de establecer una herramienta *in vitro* que permita obtener información confiable para la evaluación de generación de cepas mutantes bacterianas por exposición a agentes antimicrobianos.

Esta propuesta permite, además, obtener microorganismos resistentes que podrán ser empleados en investigaciones posteriores sin tener que recurrir, por ejemplo, a solicitar muestras clínicas que requieren de consentimientos y autorizaciones adicionales. Se han desarrollado ya diversas investigaciones empleando el cultivo continuo como una herramienta para la generación de microorganismos resistentes inducidos por la exposición a agentes antibacterianos, obteniendo resultados satisfactorios, con generación de microorganismos que pasan de ser sensibles a ser resistentes (Feng et al., 2014; Feng et al., 2016; Lee et al., 2010; Spagnolo et al., 2016; Toprak et al., 2013).

A lo largo de este documento, se propone una herramienta que permite la evaluación de la influencia de la concentración de antibiótico en la inducción de mutantes de resistencia que utiliza la técnica de cultivo continuo para inducir la aparición de resistencias en microorganismos sensibles, mediante la exposición a dosis subinhibitorias del antibiótico bajo estudio.

Objetivos

Objetivo General

Proponer una herramienta que permita medir la influencia de la concentración de antibiótico en la inducción de mutantes de resistencia.

Objetivos Específicos

- Ajustar las condiciones de cultivo continuo para bacterias sensibles al antibiótico bajo estudio.
- Evaluar la tasa de dilución y el impacto de la concentración de antibiótico en el medio sobre la generación de mutantes de resistencia.

Consideraciones éticas, legales y ambientales

Este trabajo de investigación se rigió por el cumplimiento de las disposiciones establecidas en la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, en especial lo relativo al Título IV. Capítulo I. Adicionalmente, se dio cumplimiento a la aplicación de los principios éticos del investigador como parte del aporte al conocimiento manteniendo los más altos estándares de calidad con la preservación, confidencialidad, validez, reproducibilidad y transparencia en los datos.

En lo relacionado con los aspectos de propiedad intelectual, se cumplió lo establecido por la Universidad Nacional de Colombia en el acuerdo 035 del 2003 del Consejo Académico.

Finalmente, en cumplimiento de las normas ambientales, se dispuso de los residuos de acuerdo con el Manual de Bioseguridad establecido por la Universidad Nacional de Colombia, tomando en cuenta el riesgo frente a la eliminación de material con potencial riesgo para causar daños a la salud humana y al ambiente.

1.Marco Teórico

1.1 Generación de resistencia a los antibióticos

La forma en la que los microorganismos pueden desarrollar resistencia a los antibióticos se puede dividir en dos tipos: la resistencia natural o intrínseca y la resistencia adquirida (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Oromí Durich, 2000; Quiñonez Pérez, 2017), (Figura 1-1), las cuales se explicarán a continuación:

- I. Resistencia Natural o Intrínseca: Se da como parte del proceso normal de evolución y se caracteriza porque no es inducida por ningún agente externo. En este tipo de resistencia todos los sujetos de una misma especie son resistentes a un agente o grupo de agentes antibacterianos, lo que le brinda ventajas competitivas frente a otras especies que sean sensibles (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Oromí Durich, 2000; Quiñonez Pérez, 2017).

- II. Resistencia Adquirida: Esta se caracteriza por aparecer en solo algunas cepas de una especie bacteriana que se considera normalmente sensible a un antibiótico o grupo de antibióticos (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Oromí Durich, 2000; Quiñonez Pérez, 2017). Se puede adquirir principalmente mediante dos mecanismos:
 - a. Mutaciones: En esta se dan apariciones espontáneas de individuos que se hacen resistentes como proceso adaptativo acelerado por la exposición a antibióticos, siendo este último el encargado de que aparezcan algunos mutantes en poblaciones sensibles (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Oromí Durich, 2000; Quiñonez Pérez, 2017), los

cuales pasarán la información génica de la resistencia a su progenie (transferencia de genes vertical).

b. Transferencia de genes: Este mecanismo les permite a los microorganismos adaptarse rápida y extensamente para hacer frente a medios hostiles (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Oromí Durich, 2000; Quiñonez Pérez, 2017). En esta se da un paso vertical (durante la reproducción bacteriana) u horizontal (entre bacterias de diferentes cepas o especies) de la información génica de la resistencia (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Oromí Durich, 2000; Quiñonez Pérez, 2017). Con respecto a este último se puede dar por diferentes procesos como son:

- i.** Transducción bacteriana: Este proceso de transferencia se da a través de un bacteriófago (virus bacteriano), el cual toma fragmentos de ADN de una bacteria y cuando pasa a otra, es capaz de ingresar estos fragmentos, en donde algunos codificarán para resistencia a antibióticos (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Moreno, 2009; Oromí Durich, 2000; Tortora, 2007).
- ii.** Transformación bacteriana: En este se transfieren genes de una bacteria a otra en forma de ADN exógeno desnudo, el cual es liberado una vez la bacteria muere y puede ser fácilmente captado por otra bacteria, la cual lo ingresará, adquiriendo la información génica relativa a la resistencia (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Moreno, 2009; Oromí Durich, 2000; Tortora, 2007).
- iii.** Conjugación bacteriana: En este caso, se realiza la transferencia de una especie de plásmido (ADN circular extracromosómico no requerido para el crecimiento celular). Se requiere un contacto directo entre la bacteria donadora y la receptora, allí la bacteria donante pasa una hebra del ADN con la información de la resistencia a la bacteria receptora y posteriormente las dos células sintetizan la hebra complementaria conservando así, en ambas, la información génica de la resistencia (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Moreno, 2009; Oromí Durich, 2000; Tortora, 2007).

Figura 1-1: Resumen esquemático de los tipos de resistencia antibacteriana según su forma de generación.

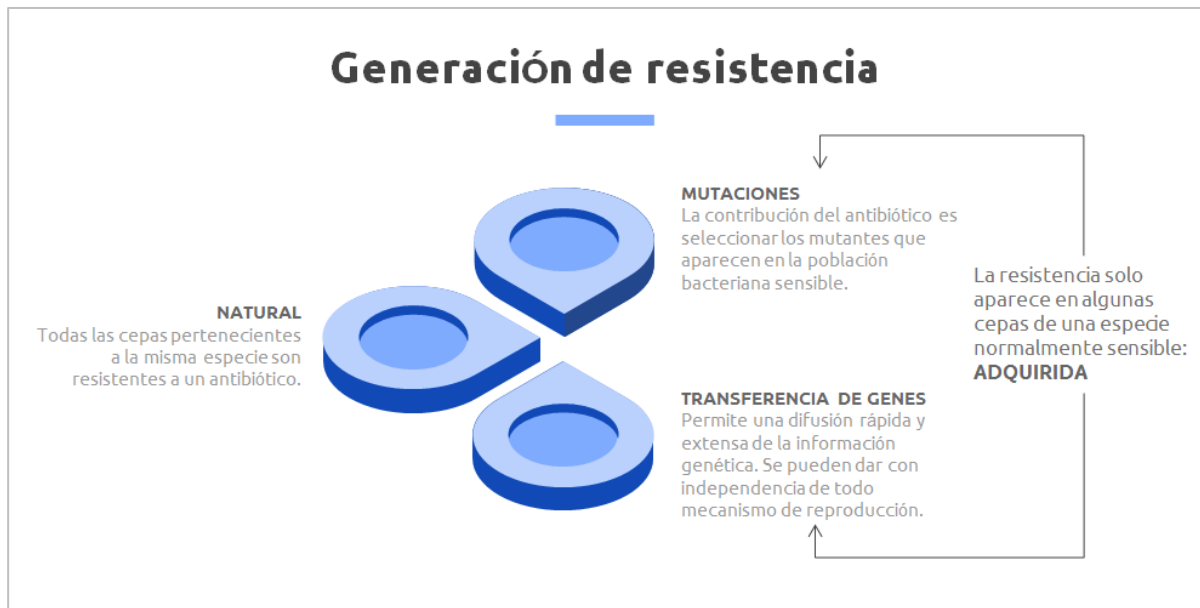


Figura diseñada con base en: (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Oromí Durich, 2000; Quiñonez Pérez, 2017).

El adecuado uso de los antibióticos se considera una importante estrategia para prevenir y mitigar en cierta medida el desarrollo de resistencias por parte de los microorganismos (OMS, 2016, 2020c). Lo anterior cobra especial importancia ya que cuando una bacteria está expuesta a un antimicrobiano, y se da lugar a la aparición de la resistencia, esta podría afectar a varios agentes del mismo grupo farmacológico, ya que comparten el mecanismo de acción frente al que la bacteria ha desarrollado la resistencia (Calva Mercado et al., 2005; Carey y McNamara, 2015; Castellanos González et al., 2015; Dawan y Ahn, 2020; Feng et al., 2014; Zhao et al., 2021). La aparición de resistencias inducidas por antibióticos es un grave problema de salud pública entre otros porque puede propiciar la aparición de microorganismos multiresistentes, extremadamente resistentes o panresistentes según el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (Gómez Ayerbe et al., 2016; López Pueyo et al., 2010; Ruiz y Cantón, 2016). Las anteriores definiciones indican que un microorganismo, además de ser resistente a un antibiótico y a los integrantes de la misma familia antibiótica, puede ser resistente a otras familias de antibióticos o en el peor de los casos no ser sensible a ningún antibiótico de ninguna categoría (Gómez Ayerbe et al., 2016; Ruiz y Cantón, 2016). En literatura ya se

han descrito previamente varios casos de este estilo, en los que microorganismos inicialmente resistentes a un agente antibacteriano han terminado mostrando resistencia frente a antibióticos de otras familias (Rincón et al., 2014; Rossi et al., 2014; Wua et al., 2021), lo que lleva a un estado de alarma muy grande frente a la pérdida de alternativas terapéuticas que puedan dar respuesta a cuadros clínicos que se presenten con este tipo de microorganismos (Fariñas y Martínez, 2013; Obolski et al., 2016; Rayner y Munckhof, 2005).

1.2 Mecanismos de acción de los antibióticos

Existen diversas formas para clasificar los antibióticos atendiendo a sus características. Para esta revisión se presenta la clasificación con base en el mecanismo de acción por el que actúan los antibióticos.

1.2.1 Inhibidores de la síntesis de pared

Dentro de las estructuras clave para protección de la célula bacteriana se encuentra la pared celular, gracias a ella la bacteria puede proteger sus organelos internos del medio, por lo que la pérdida de la pared conlleva a la lisis celular. Por lo general, los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de pared son más activos frente a bacterias gram-positivas debido a su mayor contenido en peptidoglicano en comparación con bacterias gran-negativas (Calvo y Martínez, 2009).

Entre estos se pueden encontrar la fosfomicina, la cicloserina, la vancomicina, la bacitracina (Calvo y Martínez, 2009; Paredes y Roca, 2004) y los antibióticos β -lactámicos que a su vez se dividen en penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (Suárez y Gudiol, 2009).

1.2.2 Activos en la membrana citoplasmática

La bacteria para sobrevivir requiere de la regulación entre la salida e ingreso de iones que puede afectar su metabolismo y algunos otros procesos vitales (Calvo y Martínez, 2009), es por esto que la disrupción de la membrana citoplasmática puede llevar a un desequilibrio que termine en la muerte celular. Ya que la membrana citoplasmática bacteriana tiene mucha similitud con estructuras de las células humanas, el uso de

antibióticos que actúan a este nivel puede tener una alta toxicidad para el ser humano (Calvo y Martínez, 2009).

Entre sus representantes se pueden encontrar las polimixinas, los lipopéptidos, los ionóforos y los formadores de poros (Calvo y Martínez, 2009; Paredes y Roca, 2004).

1.2.3 Inhibidores de la síntesis proteica

La síntesis de proteínas es un proceso crítico para la supervivencia de la bacteria, ya que, entre otras cosas, le permite obtener enzimas y estructuras necesarias para desempeñar las actividades que le facilita reproducirse y sobrevivir al ambiente. Los antibióticos que actúan a este nivel pueden hacerlo en varios puntos de la síntesis de proteínas lo que a su vez permite diferenciarlos (Calvo y Martínez, 2009; Paredes y Roca, 2004).

De los principales antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas se encuentran los que actúan sobre el ribosoma bacteriano como las tetraciclinas y glicilciclinas (subunidad 30S), el cloranfenicol, los macrólidos y las lincosamidas (subunidad 50S) y los aminoglucósidos (ambas subunidades del ribosoma bacteriano) (Calvo y Martínez, 2009; Paredes y Roca, 2004). También se encuentra la mupirocina que inhibe la enzima isoleucil-ARNt sintetasa, las oxazolidonas que actúan impidiendo la formación del complejo de iniciación y las estreptograminas que bloquean la acción de la peptidiltransferasa (Calvo y Martínez, 2009; Paredes y Roca, 2004).

1.2.4 Activos en el metabolismo o síntesis de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son los principales componentes del material genético, por lo que no tenerlo hace que la célula no pueda dividirse y, además, en el genoma bacteriano se tiene la información para la síntesis de proteínas que como vimos, son vitales para la bacteria (Calvo y Martínez, 2009).

Los principales exponentes de este grupo son las rifampicinas, las quinolonas, los nitroimidazoles y los nitrofuranos (Calvo y Martínez, 2009; Paredes y Roca, 2004).

1.2.5 Bloqueadores de la síntesis de factores metabólicos

Adicionalmente a todos los procesos ya mencionados, las bacterias requieren la síntesis de folatos para obtener algunos elementos esenciales que son indispensables para la supervivencia de la bacteria (Calvo y Martínez, 2009).

En este grupo se encuentran las sulfamidas, sulfonas, pirimetamina y trimetoprima (Calvo y Martínez, 2009; Paredes y Roca, 2004).

1.3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Los mecanismos de resistencia generados por las bacterias son variados, entre los principales se encuentran:

- I. **Enzimas inactivantes del antibiótico:** Estas son enzimas que tiene la capacidad de modificar o inactivar el antibiótico, haciendo así que este pierda su actividad frente a la bacteria. Un ejemplo de este son las β -lactamasas (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Moreno, 2009; Quiñonez Pérez, 2017).
- II. **Alteraciones en la permeabilidad de la membrana:** El cambio en la cantidad de porinas de membrana, hace que el antibiótico no pueda ingresar a la célula y así no hay efecto antibacteriano (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Moreno, 2009; Quiñonez Pérez, 2017).
- III. **Bombas de eflujo o expulsión:** Es un sistema fundamentado en bombas dependientes de energía que expresa la bacteria para expulsar el antimicrobiano fuera de la célula antes de que ejerza su actividad antibiótica (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Moreno, 2009; Quiñonez Pérez, 2017).
- IV. **Modificación del sitio blanco:** La bacteria puede modificar la proteína sobre la que actúe el antibiótico, y así cambiará la afinidad de este por la proteína, llevando a

la pérdida de la actividad antibacterial (Calderón Rojas y Aguilar Ulate, 2016; Fernández Riverón et al., 2003; Moreno, 2009; Quiñonez Pérez, 2017).

1.4 Piperacilina/ Tazobactam

El antibiótico Piperacilina/ Tazobactam está compuesto por dos moléculas: la piperacilina que es un antibiótico betalactámico, que bloquea la transpeptidación en la síntesis de peptidoglicano en la pared celular de la bacteria y el tazobactam que es un inhibidor de β -lactamasas (Abdelraouf et al., 2020). Este antibiótico genera un gran interés en términos de investigación, especialmente para este trabajo de investigación ya que es de gran uso a nivel hospitalario debido a su amplio espectro, evidenciándose incluso, su uso como primera opción en el tratamiento empírico de una gran variedad de infecciones (González y Cortés, 2014; Pallares y Martínez, 2012; Villa et al., 2013). Se ha descrito ya en varios documentos el alto consumo de Piperacilina/ Tazobactam en hospitales de Colombia (Pallares y Martínez, 2012). Datos publicados por el Instituto Nacional de Salud (INS), sobre el periodo de revisión de 2013-2017, indican un incremento general en el consumo de Piperacilina/ Tazobactam a nivel hospitalario e incluso indican que este antibiótico ocupa el segundo lugar en mayor consumo en Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) (INS, 2019).

Se han descrito ya algunos mecanismos por los cuales los microorganismos se hacen resistentes a la acción de la Piperacilina/ Tazobactam, entre los cuales se destacan principalmente:

- I. La modificación del sitio blanco: Bien sea modificando las PBP (Proteínas Fijadoras de Penicilina) con lo que la Piperacilina no puede actuar y generar el efecto antibacteriano o alterando las β -lactamasas con lo que el Tazobactam no podría proteger a la Piperacilina de la degradación (Mosquito et al., 2011; Schechter et al., 2018).
- II. La generación de bombas de eflujo (Santos et al., 2010).

Teniendo en cuenta el grave y creciente problema que representa la resistencia a los antibióticos y el comportamiento en cuanto a consumo y resistencias inducidas por Piperacilina/ Tazobactam, se hace necesario el desarrollo técnicas que permitan la

evaluación del impacto de la exposición de microorganismos sensibles a este antibiótico para evaluar su capacidad de generación de resistencias, con el fin de establecer una herramienta in vitro que permita obtener información confiable para la evaluación de generación de cepas mutantes bacterianas por exposición a agentes antimicrobianos.

1.5 Cultivo continuo

El cultivo continuo es una técnica útil que permite el estudio tanto a niveles microbiológicos como genéticos y bioquímicos de los microorganismos. Con esta herramienta se pueden obtener cultivos complejos de microorganismos en los que se pueden variar las condiciones de cultivo, y para el caso de esta investigación, la inclusión de un agente antibacteriano como único modificador de la población bacteriana (Quintero Ramírez, 1990).

Dentro de las ventajas del cultivo, se encuentra principalmente que la velocidad específica de crecimiento (μ) puede establecerse de acuerdo con las necesidades del ensayo y puede controlarse mediante la tasa de dilución lo que se traduce en poder tener control sobre la población celular y esto se explica porque la alimentación de medio fresco que se hace al reactor se puede fijar a un flujo constante con lo que es extraída la misma cantidad y así el volumen del cultivo permanece constante (Quintero Ramírez, 1990).

Se puede relacionar la tasa de dilución con el flujo por medio de la siguiente ecuación (Quintero Ramírez, 1990):

$$D = \frac{F}{V} \tag{1.1}$$

Donde, D es la tasa de dilución, F es el flujo y V es el volumen del cultivo. Y estos se pueden relacionar con la velocidad específica de crecimiento mediante la fórmula (Quintero Ramírez, 1990):

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x \tag{1.2}$$

Se ha descrito ya que en el estado estacionario del cultivo continuo (que se da en cuanto se alcanza una población celular estable, es decir, que no tiene variaciones significativas en el tiempo ya que el suministro de nutrientes no es limitado) el coeficiente dx/dt tiende a cero por lo que de la ecuación 1.2 se tiene que (Quintero Ramírez, 1990):

$$\mu = D \tag{1.3}$$

Reemplazando lo anterior en la ecuación 1.1 y despejando F se obtiene que (Quintero Ramírez, 1990):

$$F = D * V = \mu * V \tag{1.4}$$

Es por ello que, conociendo el valor de μ (obtenido en ensayos de cultivo para la cinética de crecimiento, ver sección 2.6) y de V (que es la capacidad del reactor, 1 litro para este trabajo) se puede calcular el flujo de acuerdo con la μ a la que se desee trabajar (Quintero Ramírez, 1990).

Es importante saber también que, con base en los datos anteriormente calculados, se puede establecer el tiempo de duplicación (t_d), que es el tiempo en que la población bacteriana pasa a ser el doble. Esto se hace mediante la siguiente ecuación (Quintero Ramírez, 1990):

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} \tag{1.5}$$

2. Materiales & Métodos

2.1 Microorganismos

Se desarrollaron los ensayos con *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

2.2 Medios de cultivo y reactivos

2.2.1 Medios de cultivo

Caldo Müeller Hinton (BD Difco™, Oxoid), Agar Müeller Hinton (Scharlau) y Solución de conservación (Caldo nutritivo (1.5g), caldo CASO (3g), triptona (1g), glicerol (10mL), sacarosa (3g) y agua destilada para completar 100 mL de solución).

2.2.2 Reactivos

NaCl, Triptona, Piperacilina/ Tazobactam 8:1 (materia prima), cefatazidima (referencia USP), ciprofloxacina (referencia USP), meropenem (materia prima), vancomicina (materia prima), linezolid (materia prima), gentamicina (referencia USP), ertapenem (materia prima), cefepime (referencia USP), agua destilada, NaOH 4N.

2.3 Materiales y Equipos

2.3.1 Materiales e instrumental de laboratorio

- Cajas de Petri plástico desechables con tapa.
- Crioviales.

- Tubos de ensayo de vidrio con capacidad de aproximadamente 10mL de tapa lisa ajustable.
- Tubos de plástico Eppendorf™.
- Tubos de plástico Falcon™ de 10mL y 50mL.
- Tubos delgados de vidrio con tapa tipo rosca.
- Erlenmeyer de fermentación.
- Probetas.
- Balones aforados.
- Frascos para preparación de medios de cultivo.
- Asas microbiológicas desechables y/o reutilizables.
- Pala desechable y/o reutilizables para plaquear cajas.
- Gradillas de plástico tamaño de acuerdo con el tubo empleado.
- Filtros Millipore.
- Reservorio para medio de cultivo fresco.

2.3.2 Equipos

- Espectrofotómetro (Spectronic® 20 Genesys).
- Incubadora a 37°C.
- Nevera de refrigeración entre 2 y 8° C.
- Nevera de congelación a -20° C.
- Balanza analítica digital.
- Balanza digital.
- Micropipetas 100-1000µl, 20-200µl, 0.5-10µL con puntas estériles desechables (Eppendorf™) azules, amarillas y transparentes.
- Celdas para espectrofotómetro desechables (Brand).
- Autoclave.
- Vórtex.
- pH metro.
- Incubadora con agitación en baño de agua.
- Baño termostatado.
- Bomba peristáltica (Millipore referencia XX80EL005).
- Mangueras siliconadas.
- Bomba de aire (Xilong AP-005).

- Reactor para desarrollo del cultivo continuo (Figura 2-6).

2.4 Preparación del inóculo

De un cultivo conservado de microorganismo se repicó en agar Müller Hilton por técnica de agotamiento y se llevó a incubación a 37°C por 24 horas para obtener colonias aisladas. De las colonias aisladas se realizaron siembras masivas en varias cajas de petri con agar Müller Hilton y se llevaron a incubación a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se agregaron 10mL de solución de conservación a las cajas y con un asa estéril azul tipo pala se recuperó el microorganismo y se fraccionó en crioviales de 2mL, para conservarlos a -20°C.

De uno de los crioviales con microorganismo concentrado, se tomó una fracción de 0.1mL y se llevó a un tubo falcon para completar a 10 mL con solución de conservación, se mezcló con ayuda del vortex y se ajustó a una transmitancia del 25% a 600 nm en espectrofotómetro Spectronic® 20 Genesys. La suspensión se fraccionó en crioviales estériles de 2ml y se almacenaron a -20°C. A esta sucesión se le determinó la población bacteriana en UFC/ml mediante recuento en placa.

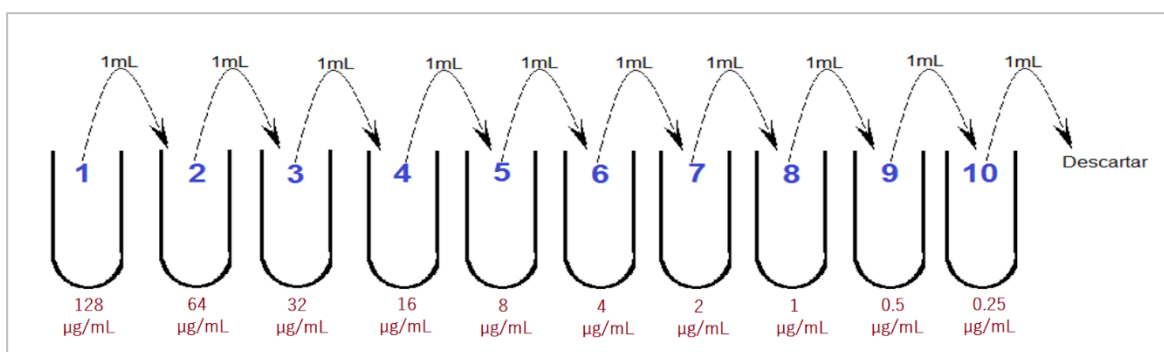
2.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Con los microorganismos seleccionados se realizó la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria para cada uno con el antibiótico Piperacilina/Tazobactam, sabiendo que la MIC se define como la concentración mínima requerida de un antimicrobiano para evitar el crecimiento de un microorganismo en una prueba de sensibilidad *in vitro* (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2012). Para ello, se empleó la técnica de microdilución en tubos de ensayo pequeños (CLSI, 2012; Lorian, 2005), la cual se explica brevemente a continuación:

Primero, se realizó la preparación de una solución madre de antibiótico de Piperacilina/Tazobactam en una relación 8:1, respectivamente. La concentración deseada para el primer tubo se fijó en 128 µg/mL con base en los valores esperados de concentración de la MIC para cada microorganismo (Lorian, 2005). Para lo anterior se preparó una solución madre de 1280 µg/mL.

Posteriormente, en 12 tubos de ensayo lisos con tapa de acero ajustable, correctamente rotulados con el número del 1 al 12, se agregó 1 mL de caldo de cultivo MH a cada tubo. Luego, en el tubo 1 se añadieron 800 μ L de caldo MH más y 200 μ L de la solución madre del antibiótico preparada a concentración de 1280 μ g/mL, obteniendo un volumen final en el tubo 1 de 2mL, y con este factor de dilución se tendría una concentración de 128 μ g/mL en el tubo 1. Después de uniformizar adecuadamente, se procede a realizar la dilución seriada del antibiótico del tubo 1 al tubo 10 pasando de a 1 mL y el mililitro sobrante del tubo 10 se descarta (Figura 2-1).

Figura 2-1: Dilución seriada. Determinación de la MIC en medio líquido.



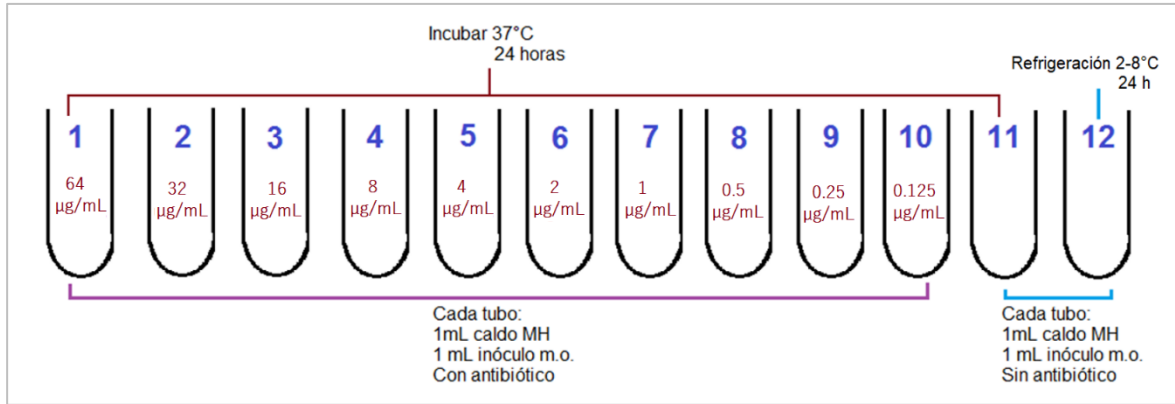
Fuente: Imagen diseñada para este documento. Esquema ilustrativo de la forma en que se realizó la dilución del antibiótico, cuando aún no había agregado microorganismo. El valor debajo de cada tubo corresponde a la concentración final de antibiótico en este paso.

Con base en lo anterior, la concentración final de antibiótico en cada tubo fue (la concentración se da en término de la piperacilina, pero se mantiene el tazobactam en relación de 1 por cada 8 de piperacilina) tal como se ilustra en la Figura 2-1.

Una vez se realizó la dilución del antibiótico, se procedió a añadir 1mL del inóculo del microorganismo a cada tubo. Este fue ajustado para tener una población resultante de 10^6 UFC/mL, lo que se estableció con base en la suspensión de microorganismos con transmitancia ajustada al 25% explicado en la sección 2.4. El mililitro de inóculo de microorganismo, en este caso se añadió a todos los tubos, del 1 al 12 y se procedió a incubar del tubo 1 al 11 a 37°C por 24 horas y el tubo 12 se almacenó en refrigeración, de 2 a 8°C, por 24 horas (Figura 2-2). Debido al efecto de dilución que generó la adición del volumen de inóculo, se redujo a la mitad la concentración del antibiótico obtenido en

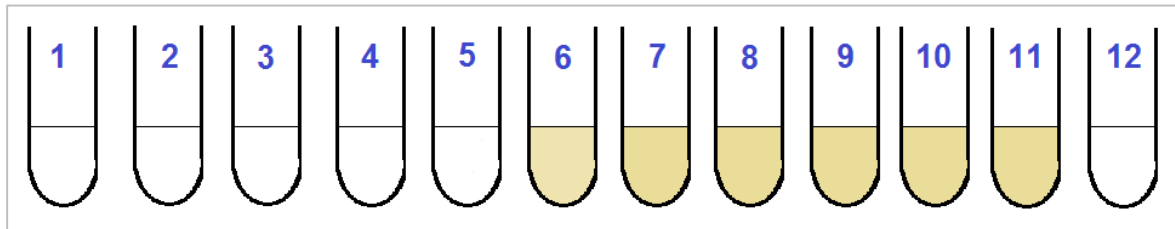
la dilución seriada, alcanzando una nueva concentración final como se observa en la Figura 2-2.

Figura 2-2: Esquema total determinación de la MIC en tubos.



Fuente: Imagen diseñada para este documento. En la figura se presentan las condiciones generales del ensayo para determinación de la MIC. Siendo los tubos del 1 al 10 los de evaluación de exposición del microorganismo al antibiótico a la concentración que se observa en cada tubo. El tubo 11 corresponde al control positivo de crecimiento ya que solo hay microorganismo con caldo fresco en incubación. El tubo 12 es el control de inhibición de crecimiento ya que contiene microorganismo en medio de cultivo fresco, pero se almacena en refrigeración, lo que inhibe el crecimiento del microorganismo.

Figura 2-3: Ejemplo crecimiento en determinación de la MIC en tubos.

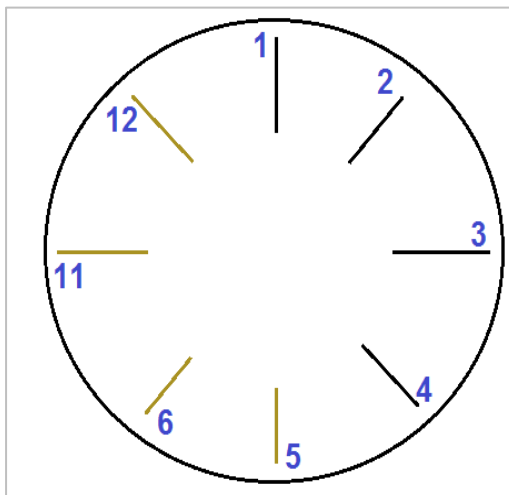


Fuente: Imagen diseñada para este documento. Esta figura ilustra un ejemplo de los resultados que se podrían esperar en el ensayo de determinación de la MIC en medio líquido. Tubos translúcidos y sin crecimiento (1, 2, 3, 4, 5 y 12). Tubos con crecimiento evidente por determinación visual de la turbidez (6, 7, 8, 9, 10 y 11).

Pasadas las 24 horas de incubación, se retiraron los tubos de la temperatura en la que se encontraban y se observó la turbidez del crecimiento de manera visual. Se debía confirmar que en el tubo 11 se observara el mayor crecimiento y que el tubo 12 no tuviera crecimiento (el medio se ve translúcido), esto con la intención de confirmar que los controles mostraran la viabilidad de las células empleadas en el ensayo y que el único factor que variara el crecimiento fuera el antibiótico. Se esperaba entonces observar

crecimiento en el tubo 11, que es el control de crecimiento bajo condiciones de incubación y en cuanto al tubo 12 se esperaba no observar crecimiento ya que sería el control de inhibición de crecimiento por refrigeración.

Figura 2-4: Ejemplo crecimiento en determinación de la MIC, siembra en agar.



Fuente: Imagen diseñada para este documento. Esta figura ilustra un ejemplo de los resultados que se podrían esperar en el ensayo de determinación de la MIC cuando se pasan a siembra en medio sólido los tubos requeridos. Las siembras de los tubos que presentaron crecimiento son las de color amarillo (5, 6, 11 y 12). Las siembras de los tubos que no presentaron crecimiento son las de color negro (1, 2, 3 y 4). Con estos resultados de ejemplo se ve el crecimiento adecuado de los controles (11 y 12) lo que confirma la viabilidad celular. La MIC correspondería a la mínima concentración de antibiótico del tubo que no creció en medio líquido, pero sí presenta crecimiento en la siembra en medio sólido, que en este caso sería la del tubo 5.

Con estas consideraciones se evaluó qué tubos tenían crecimiento y se pasó a siembra sobre agar MH los tubos que no tuvieron crecimiento y el primer tubo con crecimiento evidente, además de los tubos control (11 y 12). Figura 2-3.

Como se observa en el ejemplo ilustrado en la Figura 2-3, se siembra en agar MH los tubos 1, 2, 3, 4, 5, 6 (primero con crecimiento evidente), 11 y 12. Esta siembra se hace con un asa, la cual se introduce en el tubo a evaluar y se marca en la caja de agar mediante una pequeña línea como se puede observar en la Figura 2-4. Posteriormente, se lleva esta caja a incubación por 24 horas a 37°C. Al pasar el tiempo, se observa el crecimiento y la MIC será la siembra de la concentración más baja que crezca en la siembra de la caja, pero no en el tubo (Figura 2-4).

2.6 Evaluación de la Cinética de Crecimiento

2.6.1 Matraz

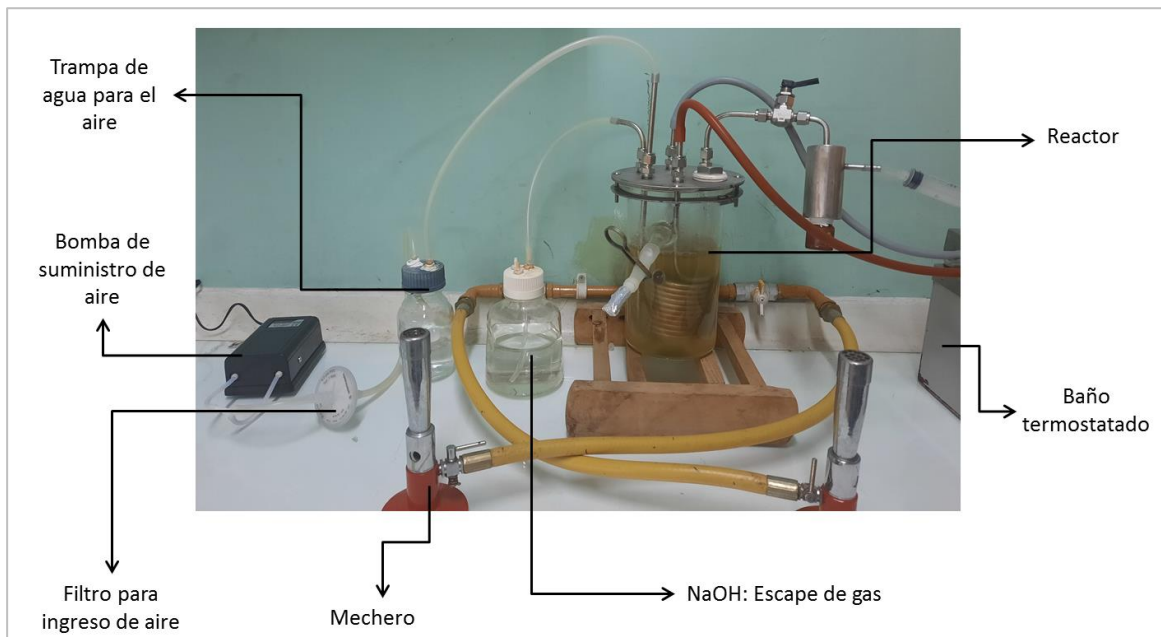
Los ensayos de cinética de crecimiento empezaron con la inoculación de microorganismo en un tubo con 10mL de caldo de cultivo MH fresco y esterilizado previamente. Este tubo se dejó en incubación por 18 horas a 37°C.

Una vez pasadas las 18 horas de incubación del tubo mencionado previamente, se tomaron 7.5mL y se dispusieron en un matraz con 150mL de caldo de cultivo MH fresco y esterilizado previamente. Tan pronto se inoculó el contenido del matraz, se agitó y se tomó 1mL para medir la absorbancia en el tiempo cero. Se llevó el matraz a incubación en baño de agua con agitación de 160 rpm, a temperatura de 37°C. La medida de absorbancia se ajustó a 600nm, tomando como blanco una muestra esterilizada de caldo de cultivo MH fresco y sin microorganismo.

La medida de absorbancia se realizó durante diferentes puntos en el tiempo, tomando de a 1mL para cada medición a 600nm y con los datos obtenidos se construyó la curva de crecimiento (en términos de Log A) en función del tiempo.

2.6.2 Reactor

Para estos ensayos se realizó lo mismo que en la evaluación de cinética en el matraz y cuando el cultivo ya estaba en fase de crecimiento exponencial, se pasó el contenido del matraz al reactor que ya tenía el caldo de cultivo y se encontraba a temperatura aproximada de 37°C. Se midió la densidad óptica de la muestra, este fue el valor a tiempo cero. Posteriormente, se tomaron muestras de 1mL cada hora o cada 30 minutos hasta que se estabilizó (se volvió constante, no hubo cambios considerables en la densidad óptica de la población microbiana). Estos datos sirvieron para conocer de manera preliminar el comportamiento del cultivo en el reactor, acá, este último funcionó en modo de lote y no como cultivo continuo (Figura 2-5).

Figura 2-5: Reactor, funcionamiento en lote.

Fuente: Imagen diseñada para este documento. En la imagen se detallan los accesorios del reactor para funcionar a modo de lote. Los mecheros garantizaban la manipulación en un ambiente que evitara la contaminación del cultivo. El NaOH se tenía a concentración 4N y permitía el escape de gas que podía llevar células las cuales eran inactivadas para evitar su salida al ambiente.

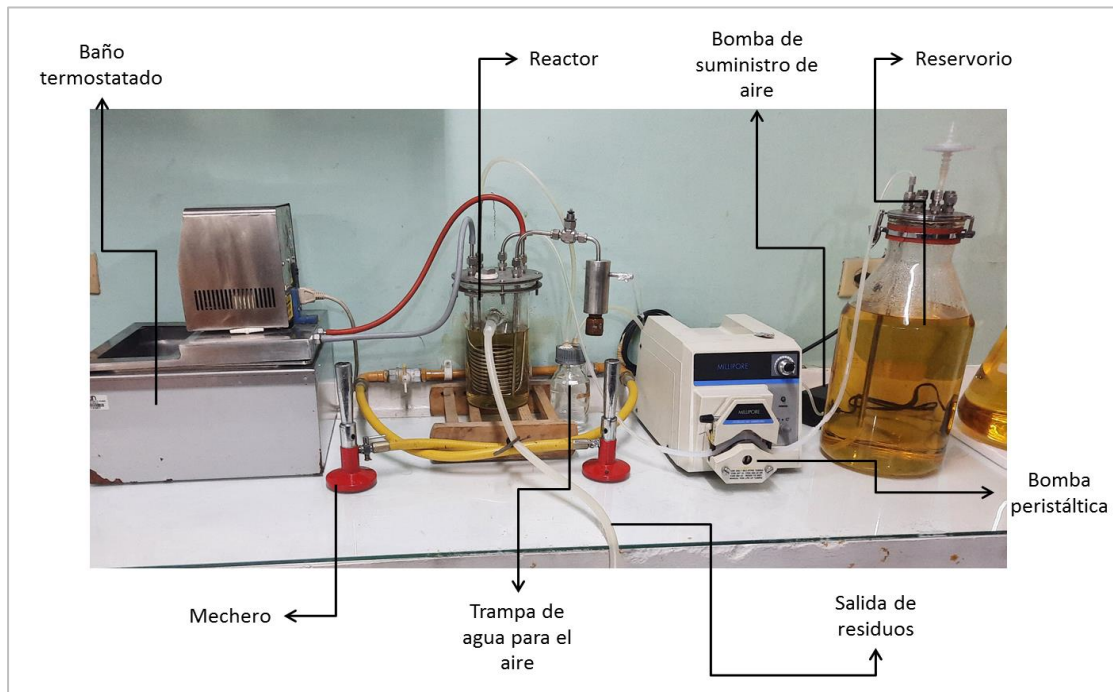
2.7 Desarrollo del Cultivo Continuo

Para el cultivo continuo los ensayos iniciaron de manera similar a la metodología descrita en los ensayos de cinética de crecimiento (sección 2.6), se realizó la inoculación de microorganismo en un tubo con 10mL de caldo de cultivo MH fresco y esterilizado previamente. Este tubo se dejó en incubación por 18 horas a 37°C.

Una vez pasadas las 18 horas de incubación del tubo mencionado previamente, se dispusieron 5mL en un matraz con 100mL de caldo de cultivo MH fresco y esterilizado previamente. Tan pronto se inoculó el contenido del matraz, se agitó y se tomó 1mL para medir la absorbancia en el tiempo cero. Se llevó el matraz a incubación en baño de agua con agitación de 160 rpm, a temperatura de 37°C. La medida de absorbancia se ajustó a 600nm, tomando como blanco una muestra esterilizada de caldo de cultivo MH fresco y sin microorganismo.

La medida de absorbancia se realizó a diferentes puntos en el tiempo, tomando de a 1 mL para cada medición a 600nm y con los datos obtenidos se construyó la curva de crecimiento (en términos de Log A) en función del tiempo. En cuanto se observó que el microorganismo estaba en zona de crecimiento exponencial (con base en la curva de cinética de crecimiento se sabía cuál era dicho punto) se pasó al reactor y se dejó en crecimiento en lote (ver sección 2.6.2), una vez se estabilizó (no había cambios importantes de la A), se cambió el modo de funcionamiento del reactor a cultivo continuo (Figura 2-6) y se dejó bajo estas condiciones hasta que se estabilizó nuevamente.

Figura 2-6: Reactor, funcionamiento en cultivo continuo.



Fuente: Imagen diseñada para este documento. En esta figura se ilustra el reactor y sus accesorios para su empleo en cultivo continuo. La salida de residuos se hizo a un galón con un filtro esterilizante ajustado para evitar la salida de microorganismo potencialmente peligrosos al ambiente.

Una vez se alcanzó la estabilidad del cultivo continuo, se dio paso a la administración de antibiótico. La administración del antibiótico se hizo de manera escalonada y esta se realizó ajustando la concentración del reservorio y del reactor, iniciando al 50% de la MIC hallada previamente para el microorganismo, pasadas 5 o 4 horas (con base en la velocidad específica de crecimiento), si el cultivo seguía estable, se aumentaba al 75%, pasadas 5 o 4 horas, si continuaba estable se aumentaba a 1MIC y se dejaba allí hasta

que se estabilizara. Se tomaron muestras de microorganismo a cada cambio de condiciones del cultivo para determinación de la MIC en medio líquido (sección 2.5) y la valoración de la resistencia en medio sólido (sección 2.8).

2.8 Evaluación de la resistencia en medio sólido

Adicionalmente a la determinación de la MIC en medio líquido (sección 2.5), se realizó una evaluación cualitativa de la resistencia que se generaba en las muestras tomadas durante el desarrollo del cultivo continuo (sección 2.7).

Para esto se prepararon cajas de agar MH con una concentración fija de antibiótico establecida con base en la MIC determinada previamente para cada microorganismo. Las 4 concentraciones evaluadas fueron 1MIC, 2MIC, 4MIC y 8MIC.

Una vez preparadas las cajas con concentración conocida de antibiótico, se procedió a inocular el microorganismo, agregando 200 μ L de la muestra de microorganismo en la superficie de la caja y se homogenizó sobre la superficie con ayuda de un asa tipo pala. Se dejó en incubación a 37°C por 24 horas. Cumplido el tiempo se observó el crecimiento y se calificó cualitativamente con base en qué tanto crecía. Este ensayo permitía tener un resultado más fácil y rápido para saber si había crecimiento de microorganismos que pudieran sobrevivir a concentraciones más altas de la MIC del antibiótico.

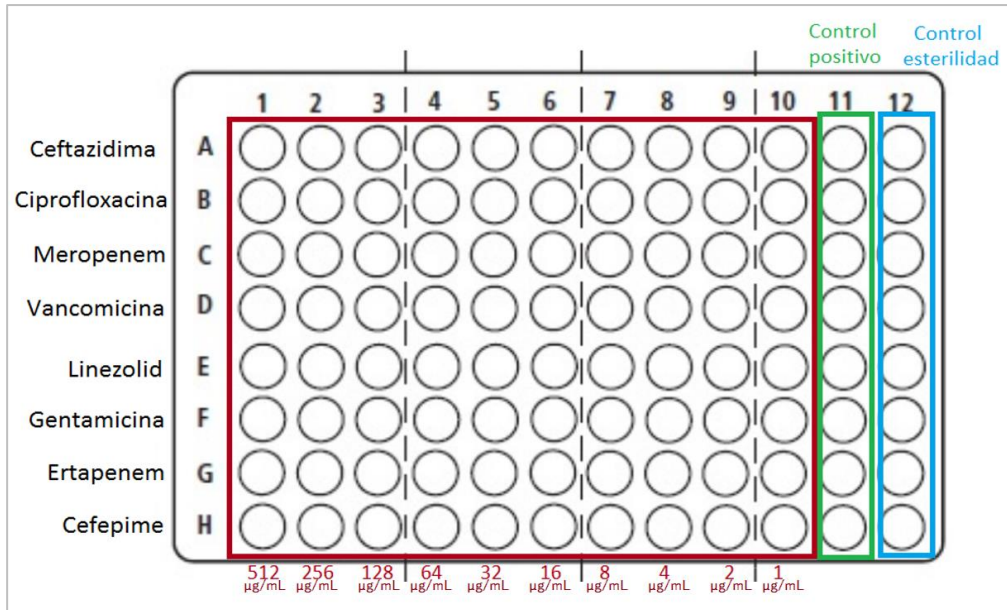
2.9 Evaluación del perfil de resistencia

Una vez se obtuvieron microorganismos mutantes de resistencia en el desarrollo de los cultivos continuos, se realizó un ensayo por duplicado para medir el perfil de resistencia de los microorganismos obtenidos frente a otros antibióticos de diferentes grupos farmacológicos. Lo anterior, mediante la medida de la MIC, empleando la siguiente metodología.

Se distribuyeron 100 μ L de caldo en cada pozo del 2 al 12. Posteriormente, se agregó 100 μ L de solución antibiótica de concentración 512 μ g/mL al pozo 1 y al pozo 2 y se procedió a realizar dilución seriada del pozo 2 al pozo 10, pasando de a 100 μ L. Una vez se habían agregado y diluido según corresponde cada uno de los antibióticos, se

agregaron 100µL de inóculo del microorganismo a todas las filas (A a la H) de la placa del pozo 1 al 11. En el pozo 12 se agregan 100µL más de caldo y este fue el control de esterilidad. Por otro lado, el pozo 11 correspondió al control positivo de crecimiento, ya que en este no había antibiótico.

Figura 2-7: Esquema determinación de la MIC en placa de 96 pozos.



Fuente: Imagen diseñada para este documento. El esquema ilustra el ensayo realizado para evaluar el perfil de resistencia de los microorganismos. Los pozos del 1 al 10 contenían una concentración que se presenta de antibiótico. El control 11 era el control positivo de crecimiento ya que solo tenía microorganismo con medio de cultivo y el tubo 12 fue el control de esterilidad ya que solo tenía medio de cultivo fresco.

La distribución de los antibióticos se desarrolló como se indica en la Figura 2-7. Para cada placa con los antibióticos a las concentraciones indicadas en la imagen, se agregó microorganismo a población de 10^4 UFC/mL.

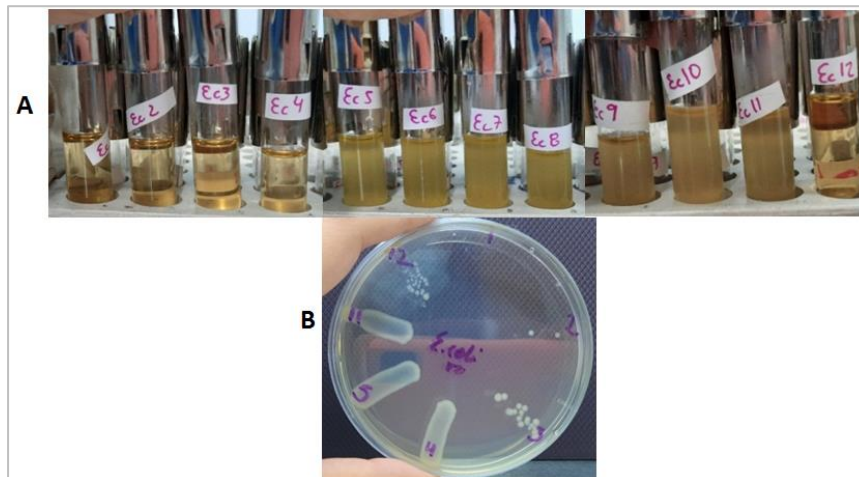
3. Resultados

3.1 Determinación previa de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

3.1.1 *Escherichia coli*

Para determinación de la MIC para la *E. coli*, se desarrollaron 7 ensayos, cada uno por triplicado. De estos ensayos la mayoría presentó crecimiento en medio líquido desde el tubo 5 (concentración de antibiótico con base en la piperacilina de $4\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 3-1. A). Posteriormente, al confirmar el crecimiento en agar, se vio crecimiento en la siembra del tubo 4 (Figura 3-1. B), por lo que la MIC hallada experimentalmente para este microorganismo se consideró alrededor de $8\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados de todas las MIC con base en los datos obtenidos en todos los ensayos se presentan en la Tabla 3-1.

Figura 3-1: Resultado crecimiento determinación previa MIC tubos. *E. coli*.



A: Determinación de la MIC en los tubos. Se ve turbidez indicativa de crecimiento en los tubos 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. Se observa translúcido sin crecimiento en los tubos 1, 2, 3, 4 y 12. El crecimiento de los controles fue el esperado. B: Determinación de la MIC pasando a siembra en medio sólido. Se ve crecimiento en la siembra de los tubos 3, 4, 5, 11 y 12. No se ve crecimiento en los tubos 1 y 2. El crecimiento de los controles fue el esperado.

Tabla 3-1: Resumen datos de la MIC para los ensayos realizados para *E. coli*.

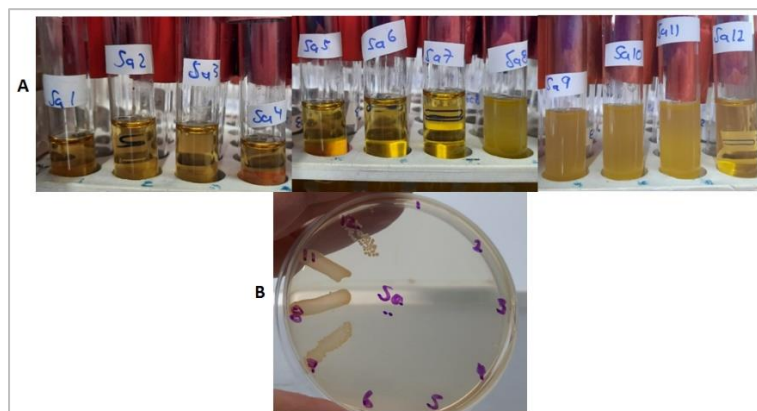
		Tubo											MIC (ug/ml)	
a \ b		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
1														8
2														8
3														16
4														8
5														16
6														16
7														8

a: Tubo de medio de cultivo que se está revisando (tubos del 1 al 12). b: Ensayo revisado (se realizaron 7 ensayos).

En cada celda, el triángulo superior derecho indica el ensayo en medio líquido y el triángulo inferior izquierdo la siembra del correspondiente tubo en agar; Si el color es gris indica que no hubo crecimiento, si es blanco quiere decir que ese tubo no se pasó a medio sólido y por ende no fue evaluado, si es azul claro indica que sí hubo crecimiento en el tubo en medio líquido y si es azul oscuro indica que sí hubo crecimiento en la siembra del tubo en agar. La concentración del tubo que presentó crecimiento de la siembra en medio sólido, pero no mostró crecimiento en el tubo en medio líquido fue el valor determinado como la MIC.

3.1.2 *Staphylococcus aureus*

Para la determinación de la MIC para el *S. aureus*, se desarrollaron 7 ensayos, cada uno por triplicado. De estos ensayos la mayoría presentó crecimiento en medio líquido desde el tubo 8 (concentración de antibiótico con base en la piperacilina de 0.5µg/ mL) (Figura 3-2. A). Posteriormente, al confirmar el crecimiento en agar, se vio crecimiento en la siembra del tubo 7 (Figura 3-2. B), por lo que la MIC hallada experimentalmente para este microorganismo se consideró alrededor de 1µg/ mL. Los resultados de todas las MIC con base en los datos obtenidos en todos los ensayos se presentan en la Tabla 3-2.

Figura 3-2: Resultado crecimiento determinación previa MIC tubos. *S. aureus*.

A: Determinación de la MIC en los tubos. Se ve turbidez indicativa de crecimiento en los tubos 8, 9, 10 y 11. Se observa translúcido sin crecimiento en los tubos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 12. El crecimiento de los controles fue el esperado. B: Determinación de la MIC pasando a siembra en medio sólido. Se ve crecimiento en la siembra de los tubos 7, 8, 11 y 12. No se ve crecimiento en los tubos 1, 2, 3, 4, 5 y 6. El crecimiento de los controles fue el esperado.

Tabla 3-2: Resumen datos de la MIC para los ensayos realizados para *S. aureus*.

		Tubo												MIC (ug/mL)	
a	b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
	1														1
	2														2
	3														1
	4														No es claro
	5														1
	6														1
	7														1

a: Tubo de medio de cultivo que se está revisando (tubos del 1 al 12). b: Ensayo revisado (se realizaron 7 ensayos).

En cada celda, el triángulo superior derecho indica el ensayo en medio líquido y el triángulo inferior izquierdo la siembra del correspondiente tubo en agar; Si el color es gris indica que no hubo crecimiento, si es blanco quiere decir que ese tubo no se pasó a medio sólido y por ende no fue evaluado, si es lila indica que sí hubo crecimiento en el tubo en medio líquido y si es morado oscuro indica que sí hubo crecimiento en la siembra del tubo en agar. La concentración del tubo que presentó crecimiento de la siembra en medio sólido, pero no mostró crecimiento en el tubo en medio líquido fue el valor determinado como la MIC.

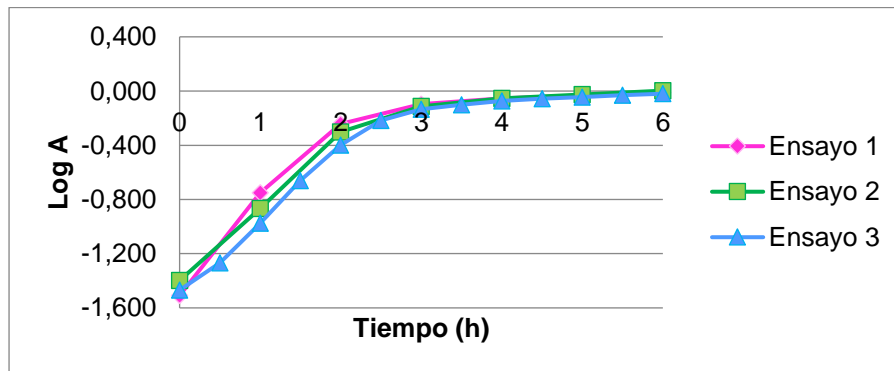
3.2 Evaluación de la Cinética de Crecimiento

3.2.1 Matraz

3.2.1.1 *Escherichia coli*

Se realizaron tres ensayos, cada uno con muestreos cada hora durante seis horas, y para el tercer ensayo se realizaron, además, muestreos cada media hora. Figura 3-3.

Figura 3-3: Curvas de crecimiento *E. coli*.

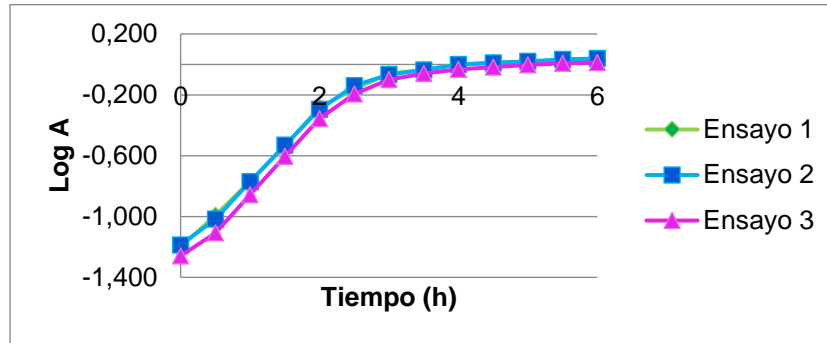


Con base en la zona exponencial de las curvas se obtuvieron tres pendientes con valores de: $0,5062 \text{ h}^{-1}$, $0,5646 \text{ h}^{-1}$ y $0,5848 \text{ h}^{-1}$. Se calculó promedio de estos tres valores obteniendo: $0,5519 \text{ h}^{-1}$, con desviación estándar de $0,0408$. Se tiene $\mu=0,5519 \text{ h}^{-1}$

3.2.1.2 *Staphylococcus aureus*

Se realizaron tres ensayos, cada uno con muestreos cada media hora. Figura 3-4.

Figura 3-4: Curvas de crecimiento *S. aureus*.



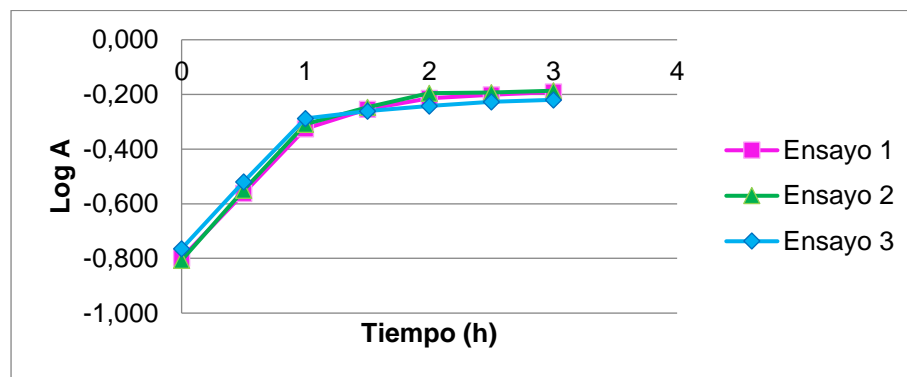
Con base en la zona exponencial de las curvas se obtuvieron tres pendientes con valores de: $0,4718 \text{ h}^{-1}$, $0,4812 \text{ h}^{-1}$ y $0,5005 \text{ h}^{-1}$. Se calculó promedio de estos tres valores obteniendo: $0,4845 \text{ h}^{-1}$, con desviación estándar de $0,0146$. Se tiene $\mu=0,4845 \text{ h}^{-1}$

3.2.2 Reactor

3.2.2.1 *Escherichia coli*

Se realizaron tres ensayos, Figura 3-5. Al igual que para el matraz, se determinó la velocidad específica de crecimiento para el reactor con base en la zona exponencial de las curvas (Quintero Ramírez, 1990). Empleando la ecuación 1.4 (sección 1.5) se calculó el flujo para tener el 50% de la velocidad específica de crecimiento, sabiendo que el volumen del reactor es de 1L. El valor obtenido para el flujo fue de 258,7 mL/h.

Figura 3-5: Cinética de crecimiento en reactor. *E. coli*.



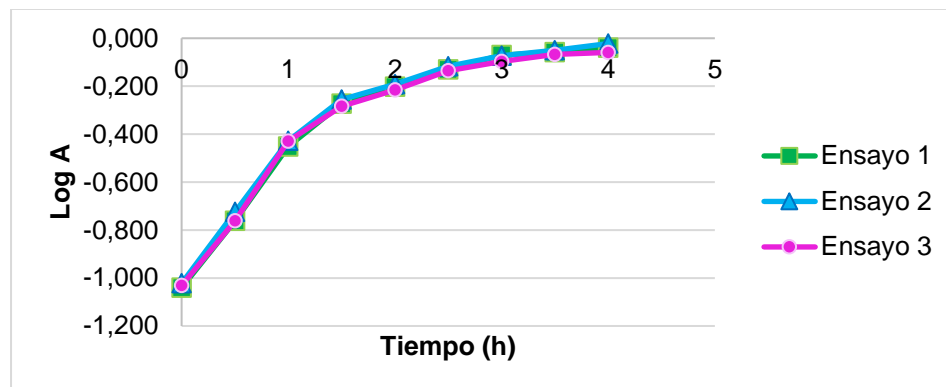
Se obtuvieron tres pendientes con valores de: $0,4735 \text{ h}^{-1}$, $0,4980 \text{ h}^{-1}$ y $0,4771 \text{ h}^{-1}$. El promedio de estos tres valores es $0,4829 \text{ h}^{-1}$, con desviación estándar de $0,0132$. Se tiene $\mu=0,4829 \text{ h}^{-1}$

Adicionalmente, empleando la ecuación 1.5 se calculó el tiempo de duplicación (t_d) (a una velocidad específica de crecimiento del 50%) obteniendo 2,68 h.

3.2.2.2 *Staphylococcus aureus*

Se realizaron tres ensayos, Figura 3-6. Al igual que para el matraz, se determinó la velocidad específica de crecimiento para el reactor con base en la zona exponencial de las curvas (Quintero Ramírez, 1990). Empleando la ecuación 1.4 (sección 1.5) se calculó el flujo para tener el 50% de la velocidad específica de crecimiento, sabiendo que el volumen del reactor es de 1L. El valor obtenido para el flujo fue de 269,5 mL/h.

Figura 3-6: Cinética de crecimiento en reactor. *S. aureus*.



Se obtuvieron tres pendientes con valores de: $0,5887 \text{ h}^{-1}$, $0,5940 \text{ h}^{-1}$ y $0,6021 \text{ h}^{-1}$. El promedio de estos tres valores es $0,5949 \text{ h}^{-1}$, con desviación estándar de $0,0067$. Se tiene $\mu=0,5949 \text{ h}^{-1}$

Adicionalmente, empleando la ecuación 1.5 se calculó el tiempo de duplicación (t_d) (a una velocidad específica de crecimiento del 50%) obteniendo 2,57 h.

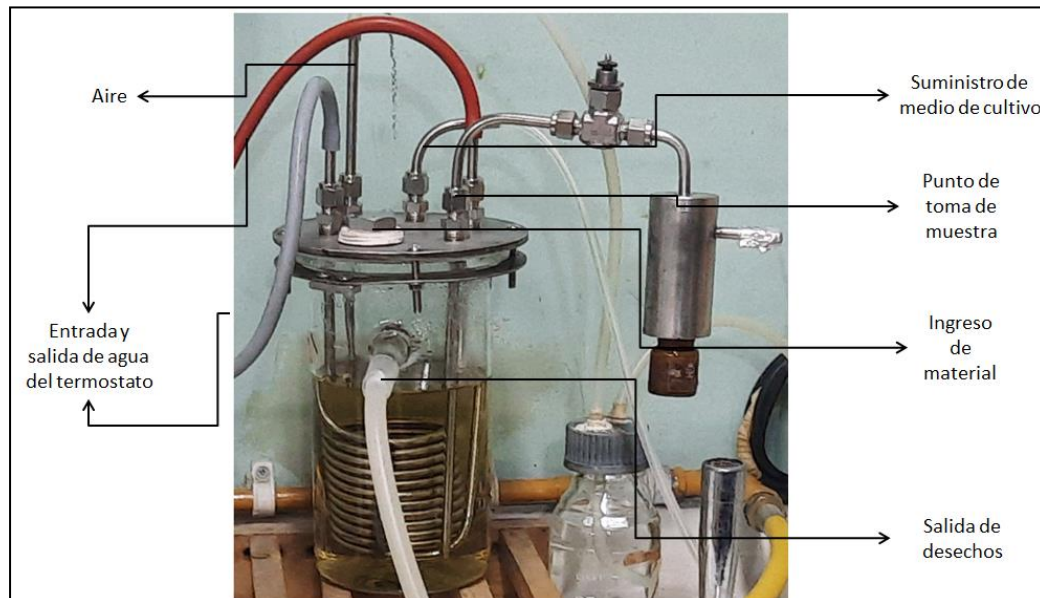
3.3 Desarrollo del Cultivo Continuo

El reactor diseñado (Figura 3-7) fundamenta su funcionamiento en la administración continua de caldo de cultivo, bien fuera fresco o con una concentración definida de antibiótico, a un flujo constante, establecido con base en la velocidad específica de crecimiento (μ). La administración de medio de cultivo a una tasa de velocidad constante garantiza que se dé un crecimiento uniforme de la biomasa en el cultivo, es importante que el ingreso de medio de cultivo se relacione con el volumen de salida, ya que así se mantiene una cantidad de nutrientes constante y se permite el crecimiento estable del medio de cultivo, el cual puede ser medido por espectrofotometría a 600 nm (Castañeda,

2019; Feng et al., 2014; Feng et al., 2016; Quintero Ramírez, 1990; Spagnolo et al., 2016; Toprak et al., 2013).

La velocidad específica de crecimiento se conoce también como la velocidad de producción de biomasa y está relacionada con la velocidad a la que un individuo se replica y tiene como unidades h^{-1} , por lo que se relaciona con el flujo al que se pasa el caldo de cultivo fresco al medio (Castañeda, 2019; Quintero Ramírez, 1990; Toprak et al., 2013). Ya que la intención es obtener una cantidad grande de biomasa, se decide fijar la tasa de flujo al medio como el 50% de velocidad específica de crecimiento calculada a partir de la zona de crecimiento exponencial (Sección 3.2.2.). Estudios similares ya han empleado tasas de dilución de $0.3 h^{-1}$ que equivalían a aproximadamente el 40% de μ obteniendo buenos resultados en producción de biomasa de microorganismos (Feng et al., 2016).

Figura 3-7: Partes del reactor.



Fuente: Imagen diseñada para este documento. Esquema de las partes del reactor. Capacidad de 1L.

El suministro de aire se realizó empleando una bomba de aire convencional de pecera (Xilong AP-005), pasando por una trampa de agua estéril y filtrado para garantizar la esterilidad del medio. Este bombeo de aire fue constante y adicionalmente, ya que ingresaba por la parte baja del reactor. Esa mezcla aire-líquido al ser menos densa que

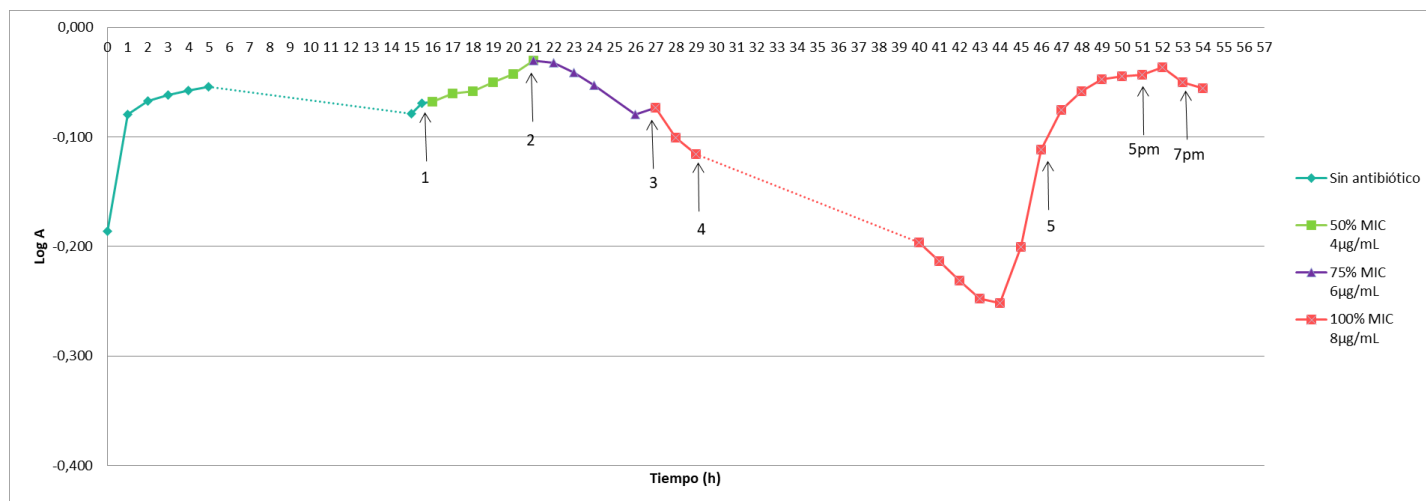
el cultivo hacía subiera generando la agitación del medio, promoviendo así la agitación homogénea del mismo, brindando también la ventaja de no requerir de agitación mecánica (Castañeda, 2019; Quintero Ramírez, 1990; Toprak et al., 2013).

En relación con la temperatura se buscó mantenerla alrededor de 37°C mediante el flujo de agua desde un termostato en tubos de metal hacía el interior del reactor, por lo que se asume esta temperatura como la temperatura del medio con base en el concepto de equilibrio térmico (Jiménez y Lemos, 2001). En cuanto al pH, este se fijó en 7.3 ± 0.1 en el medio de cultivo (Fisher Scientific, 2022a, 2022b). EL medio de cultivo empleado para todos los ensayos se mantuvo caldo y agar MH ya que permitía proveer los nutrientes requeridos para el crecimiento óptimo de los microorganismos y es ideal para el desarrollo de ensayos de sensibilidad antibiótica (Fisher Scientific, 2022a, 2022b).

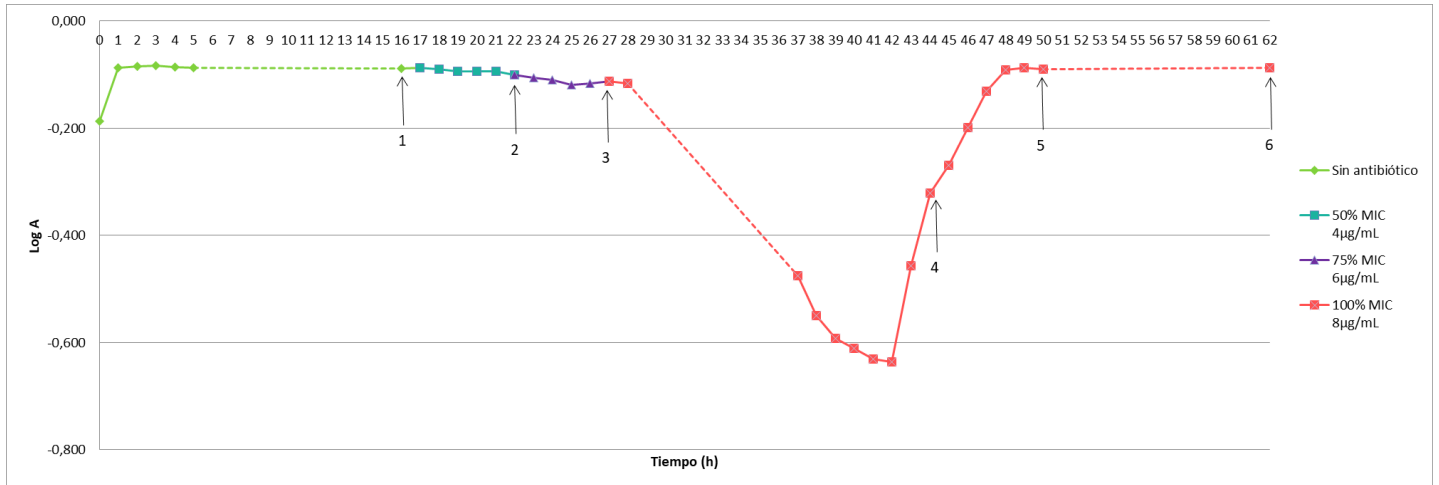
3.3.1 *Escherichia coli*

El ensayo de cultivo continuo para este microorganismo a las condiciones anteriormente descritas se desarrolló por duplicado.

Figura 3-8: Cambio en el crecimiento del cultivo continuo 1. *E. coli*.



En el gráfico se observa la densidad óptica que se midió en el tiempo. Sección azul: Administración de medio de cultivo sin antibiótico. Sección verde: medio con antibiótico aproximadamente al 50% de la MIC. Sección morada: medio con antibiótico aproximadamente al 75% de la MIC. Sección roja: medio con antibiótico aproximadamente al 100% de la MIC. Las flechas con los números indican los puntos en los que se tomaron muestras para determinación y evaluación de la MIC. Muestra 1(a las 15h); Muestra 2(a las 21h); Muestra 3(a las 27h); Muestra 4(a las 29h); Muestra 5(a las 45h); Muestra 5pm(a las 51h); Muestra 7pm(a las 53h).

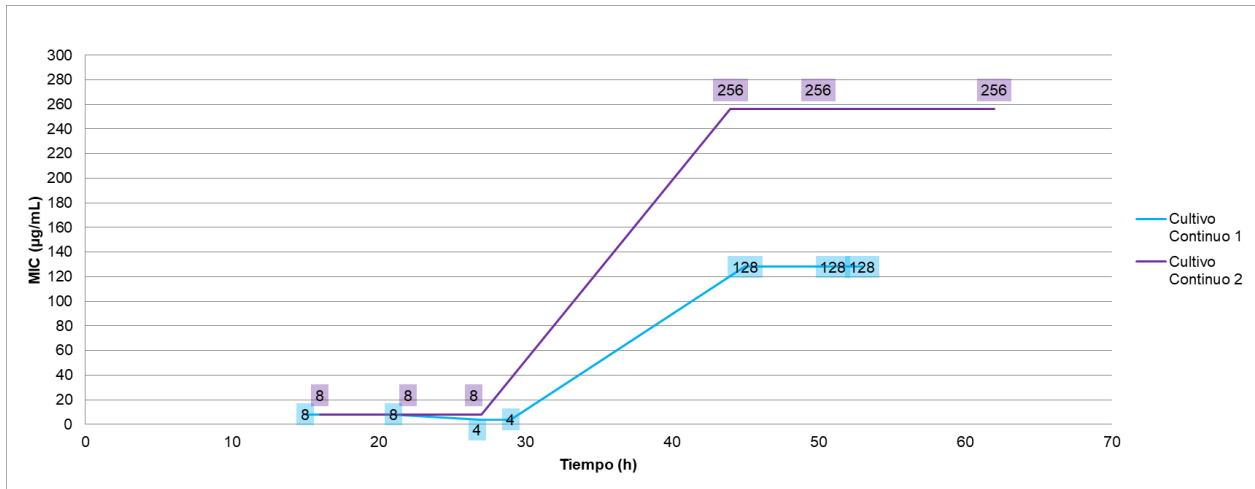
Figura 3-9: Cambio en el crecimiento del cultivo continuo 2. *E. coli*.

En el gráfico se observa la densidad óptica que se midió en el tiempo. Sección verde: Administración de medio de cultivo sin antibiótico. Sección azul: medio con antibiótico aproximadamente al 50% de la MIC. Sección morada: medio con antibiótico aproximadamente al 75% de la MIC. Sección roja: medio con antibiótico aproximadamente al 100% de la MIC. Las flechas con los números indican los puntos en los que se tomaron muestras para determinación y evaluación de la MIC. Muestra 1(a las 16h); Muestra 2(a las 22h); Muestra 3(a las 27h); Muestra 4(a las 44h); Muestra 5(a las 50h); Muestra 6(a las 62h).

De las muestras de microorganismos tomadas se realizó recuento en placa para ajustar las poblaciones y con base en ello se realizó la evaluación de la MIC en medio líquido (se emplearon las mismas concentraciones para los tubos, presentadas en la determinación previa de la MIC). De los microorganismos cuya medida de la MIC en medio líquido superaban las concentraciones definidas previamente (Figura 2-2) se realizó el ensayo con la misma metodología, pero las concentraciones finales de antibiótico de los tubos se cambiaron teniendo como la concentración del tubo 1=2048 µg/mL (ver Anexo A.).

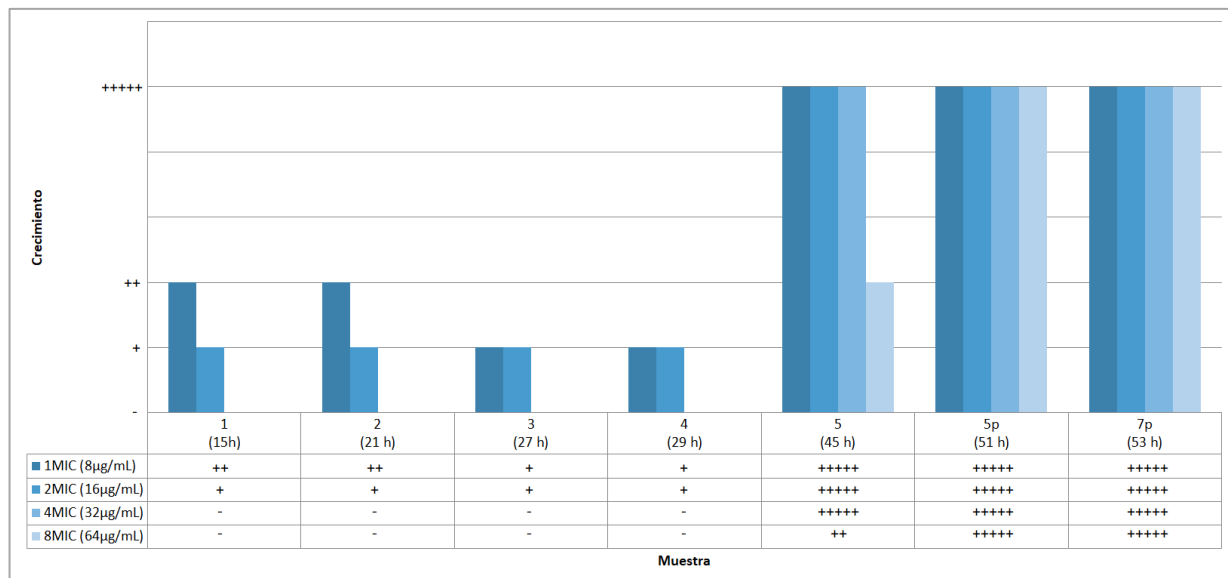
Adicionalmente a la determinación de la MIC en medio líquido, se hizo un ensayo para evaluar el crecimiento de los microorganismos de cada muestra en medio sólido, con diferentes concentraciones de antibiótico según la MIC.

Figura 3-10: Cambios en la MIC de las muestras de *E. coli*.

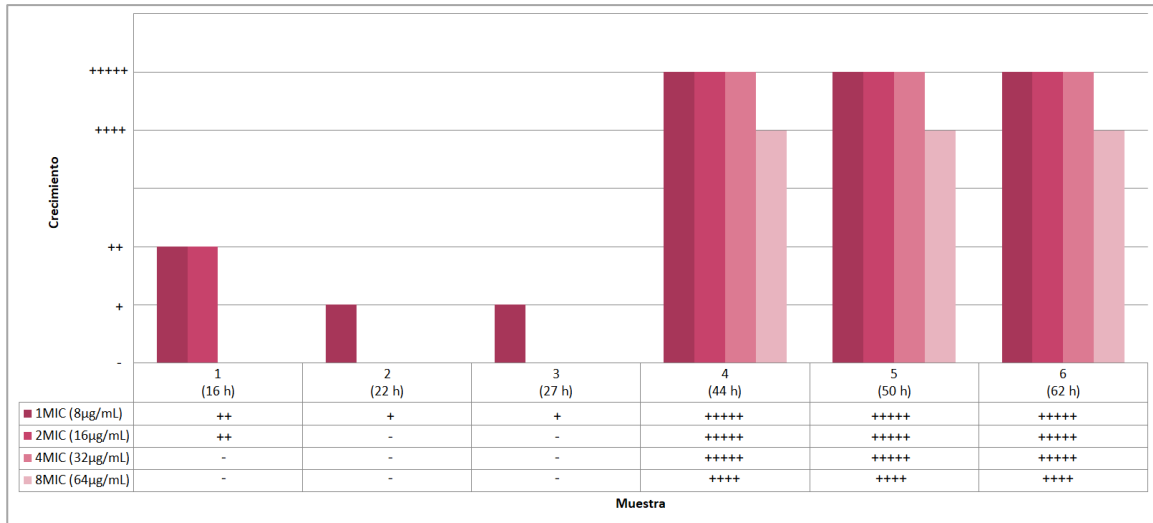


Se presenta el valor medido de la MIC en las muestras tomadas en ciertos puntos de tiempo del cultivo continuo. Hay un cambio evidente de la MIC de hasta 16 veces el valor inicial para el cultivo continuo 1 y hasta 32 veces el valor inicial para el cultivo continuo 2.

Figura 3-11: MIC en medio sólido. Cultivo continuo 1. *E. coli*.



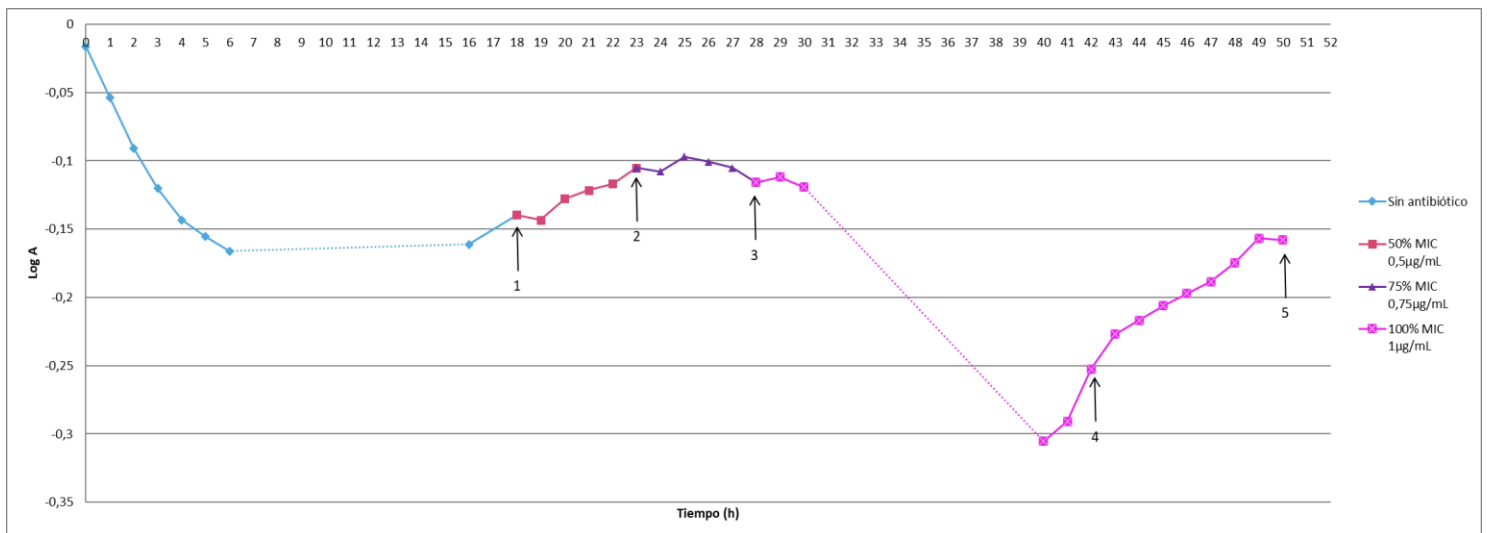
De la valoración de la MIC en medio sólido se observa que las muestras tomadas después de la recuperación de la densidad óptica en el cultivo continuo (Muestras 5, 5p y 7p) hay un crecimiento más abundante en las cajas con valores de MIC más altos. La valoración se hizo de manera cuantitativa por lo que a más “+” se valoró como crecimiento más abundante.

Figura 3-12: MIC en medio sólido. Cultivo continuo 2. *E. coli*.

De la valoración de la MIC en medio sólido se observa que las muestras tomadas después de la recuperación de la densidad óptica en el cultivo continuo (Muestras 4, 5 y 6) hay un crecimiento más abundante en las cajas con valores de MIC más altos. La valoración se hizo de manera cuantitativa por lo que a más "+" se valoró como crecimiento más abundante.

3.3.2 *Staphylococcus aureus*

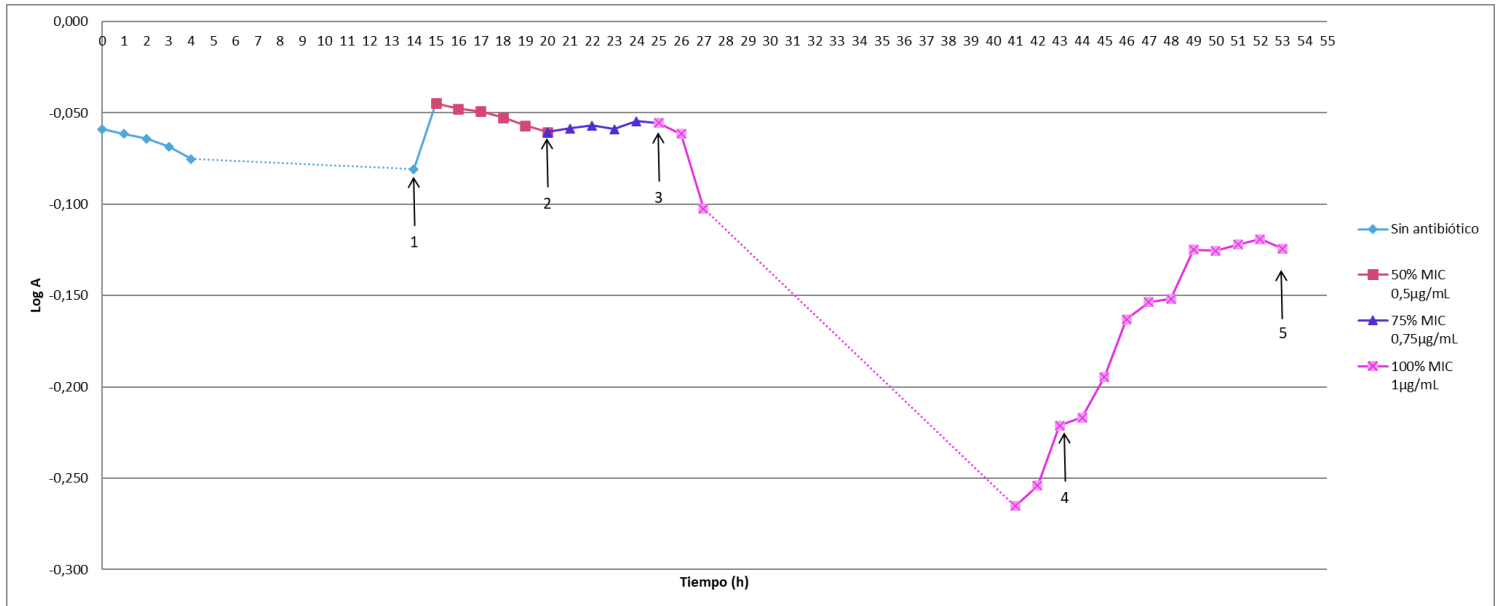
El ensayo de cultivo continuo para este microorganismo a las condiciones anteriormente descritas se desarrolló por duplicado.

Figura 3-13: Cambio en el crecimiento del cultivo continuo 1. *S. aureus*.

En el gráfico se observa la densidad óptica que se midió en el tiempo. Sección azul: Administración de medio de cultivo sin antibiótico. Sección roja: medio con antibiótico aproximadamente al 50% de la MIC. Sección morada: medio con antibiótico

aproximadamente al 75% de la MIC. Sección rosada: medio con antibiótico aproximadamente al 100% de la MIC. Las flechas con los números indican los puntos en los que se tomaron muestras para determinación y evaluación de la MIC. Muestra 1(a las 18h); Muestra 2(a las 23h); Muestra 3(a las 28h); Muestra 4(a las 42h); Muestra 5(a las 50h).

Figura 3-14: Cambio en el crecimiento del cultivo continuo 2. *S. aureus*.

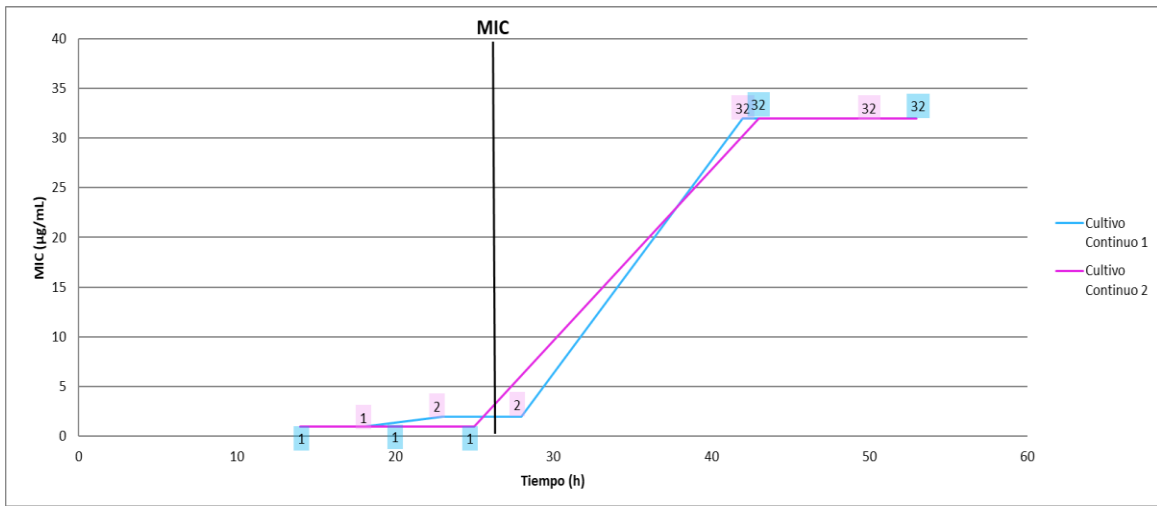


En el gráfico se observa la densidad óptica que se midió en el tiempo. Sección azul: Administración de medio de cultivo sin antibiótico. Sección roja: medio con antibiótico aproximadamente al 50% de la MIC. Sección morada: medio con antibiótico aproximadamente al 75% de la MIC. Sección rosada: medio con antibiótico aproximadamente al 100% de la MIC. Las flechas con los números indican los puntos en los que se tomaron muestras para determinación y evaluación de la MIC. Muestra 1(a las 14h); Muestra 2(a las 20h); Muestra 3(a las 25h); Muestra 4(a las 43h); Muestra 5(a las 53h).

De las muestras tomados se realizó recuento en placa para ajustar las poblaciones y con base en ello se realizó la evaluación de la MIC en medio líquido (se emplearon las mismas concentraciones para los tubos, presentadas en la determinación previa de la MIC).

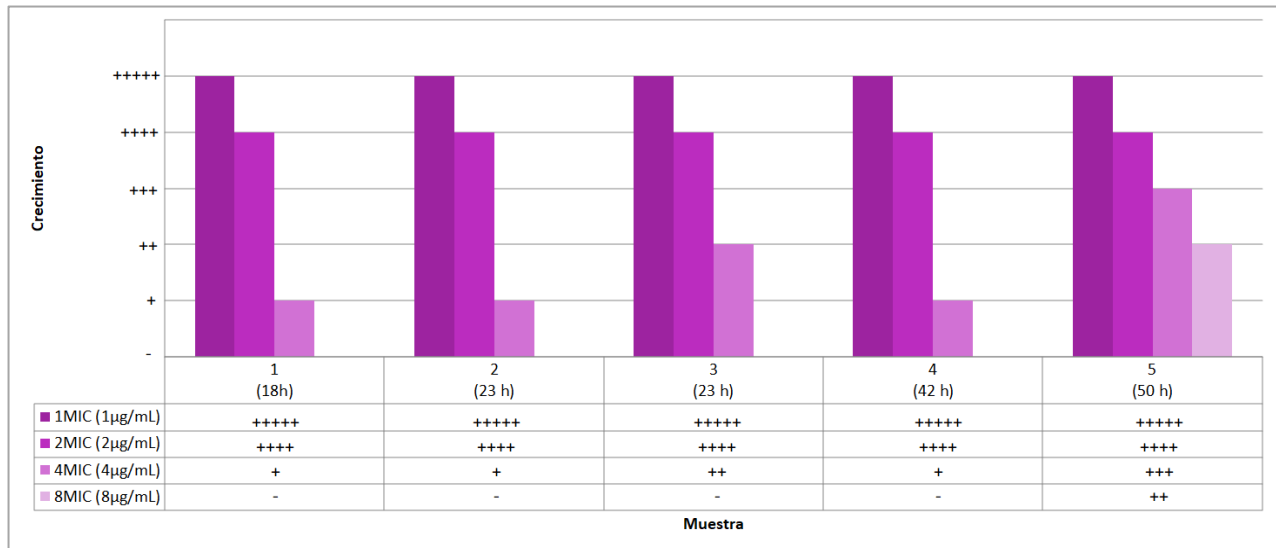
Adicionalmente a la determinación de la MIC en medio líquido, se hizo un ensayo para evaluar el crecimiento de los microorganismos de cada muestra en medio sólido, con diferentes concentraciones de antibiótico según la MIC.

Figura 3-15: Cambios en la MIC de las muestras de *S. aureus*.



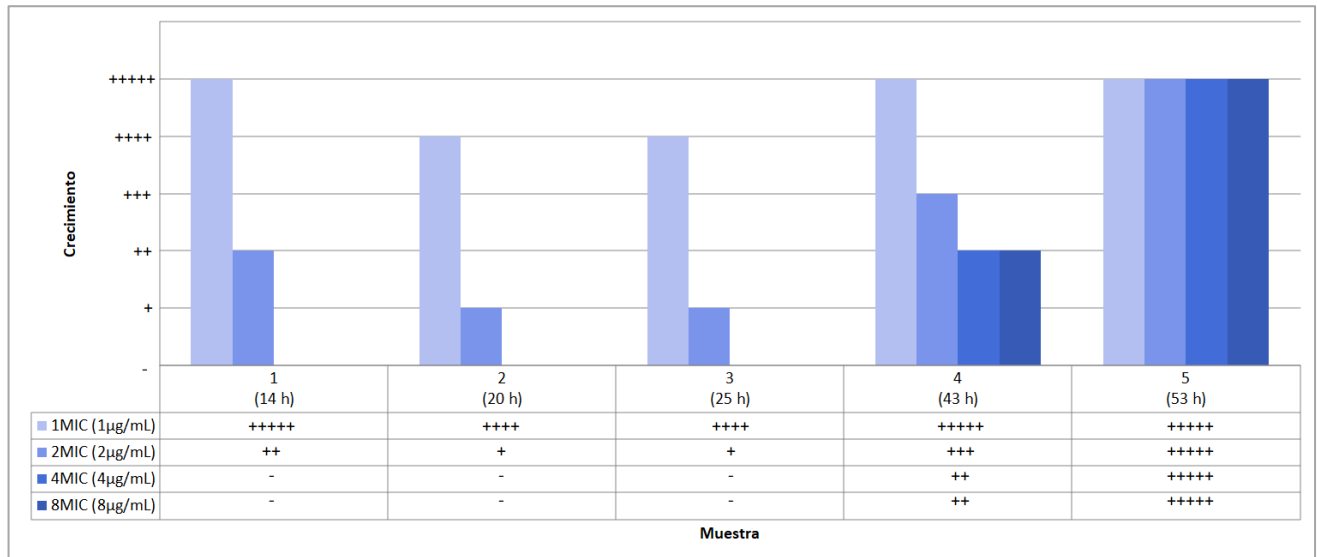
Se presenta el valor medido de la MIC en las muestras tomadas en ciertos puntos de tiempo del cultivo continuo. Hay un cambio evidente de la MIC de hasta 32 veces el valor inicial tanto para el cultivo continuo 1 como para el cultivo continuo 2.

Figura 3-16: MIC en medio sólido. Cultivo continuo 1. *S. aureus*.



De la valoración de la MIC en medio sólido se observa que las muestras tomadas después de la recuperación de la densidad óptica en el cultivo continuo (Muestras 4 y 5) hay un crecimiento más abundante en las cajas con valores de MIC más altos. La valoración se hizo de manera cuantitativa por lo que a más "+" se valoró como crecimiento más abundante.

Figura 3-17: MIC en medio sólido. Cultivo continuo 2. *S. aureus*.



De la valoración de la MIC en medio sólido se observa que las muestras tomadas después de la recuperación de la densidad óptica en el cultivo continuo (Muestras 4y 5) hay un crecimiento más abundante en las cajas con valores de MIC más altos. La valoración se hizo de manera cuantitativa por lo que a más “+” se valoró como crecimiento más abundante.

3.4 Evaluación del perfil de resistencia

Una vez se identificaron los microorganismos resistentes de cada ensayo de cultivo continuo, se realizó una evaluación de la MIC frente a varios agentes antibacterianos pertenecientes a grupos farmacológicos variados (ver sección 2.9.). Se escogieron dos muestras de los microorganismos resistentes (el criterio de selección fue tomar los que presentaron mayores valores de la MIC) de cada ensayo de cultivo continuo tanto para la *E. coli* como para el *S. aureus* y se comparó realizando el ensayo también a los microorganismos iniciales que son sensibles. Los resultados se presentan a continuación:

3.4.1 *Escherichia coli*

Tabla 3-3: MIC frente a varios antibióticos. *E. coli*.

Muestra Antibiótico	MIC (µg/mL)				
	Inicial	1.1	1.2	2.1	2.2
Ceftazidima	8	128	128	256	256
Meropenem	0	2	2	4	4
Ertapenem	0	8	8	16	16
Cefepime	0	16	16	32	32
Gentamicina	2	4	2	2	4
Ciprofloxacina	4	64	64	128	64
Vancomicina	4	32	32	16	16
Linezolid	256	256	256	256	128

Inicial: Son los microorganismos sensibles a Piperacilina/Tazobactam. 1.1 y 1.2: Son muestras de los microorganismos tomados del cultivo continuo 1 que demostraron ser resistentes. 2.1 y 2.2: Son muestras de los microorganismos tomados del cultivo continuo 2 que demostraron ser resistentes.

3.4.2 *Staphylococcus aureus*

Tabla 3-4: MIC frente a varios antibióticos. *S. aureus*.

Muestra Antibiótico	MIC (µg/mL)				
	Inicial	1.1	1.2	2.1	2.2
Cefazidima	16	512	512	512	512
Meropenem	2	16	8	16	16
Ertapenem	2	16	16	16	16
Cefepime	8	64	64	64	64
Gentamicina	2	4	2	4	2
Ciprofloxacina	2	8	8	4	8
Vancomicina	2	2	2	4	4
Linezolid	4	8	8	8	4

Inicial: Son los microorganismos sensibles a Piperacilina/Tazobactam. 1.1 y 1.2: Son muestras de los microorganismos tomados del cultivo continuo 1 que demostraron ser resistentes. 2.1 y 2.2: Son muestras de los microorganismos tomados del cultivo continuo 2 que demostraron ser resistentes.

4. Discusión

La aparición de resistencias a antibióticos por parte de las bacterias se ha relacionado ya con exposiciones a concentraciones por debajo del valor de la concentración mínima inhibitoria (Feng et al., 2014; Feng et al., 2016; Lee et al., 2010; Spagnolo et al., 2016; Tonoyan et al., 2019), lo cual se puede dar desde el uso inapropiado de los antibióticos bien sea en el ámbito hospitalario o ambulatorio e incluso por exposición ambiental secundario al uso de antibióticos en veterinaria, ganadería y algunos procesos industriales. (Barrantes Jiménez et al., 2022; López Pueyo et al., 2010; OMS, 2016, 2020b).

En este estudio se propuso la utilización de una herramienta de cultivo continuo construida con base en algunos conceptos de ingeniería bioquímica (Castañeda, 2019; Quintero Ramírez, 1990; Toprak et al., 2013) que permiten el desarrollo de un cultivo continuo para exponer la bacteria a concentraciones por debajo de la MIC hasta la estabilización del cultivo seguido mediante medidas de densidad óptica. Con dicha herramienta, se logró la obtención de microorganismos resistentes, confirmado mediante el cambio en la MIC del comienzo del cultivo hasta que finalizó pasadas aproximadamente 55 horas, de las cuales más o menos 40 horas correspondieron a exposición antibiótica.

Con base en los resultados de cinética de crecimiento, para los dos microorganismos, y la etapa inicial de desarrollo de los ensayos de cultivo continuo, se vio que los microorganismos crecían y se estabilizaban durante la primera noche, estando así alrededor de 15 horas en cultivo continuo sin antibiótico, con el fin de garantizar un cultivo estable y con producción de biomasa adecuada para empezar el ensayo con antibiótico, teniendo la población en estado de meseta (Quintero Ramírez, 1990). Luego de este punto se empezó la administración de antibiótico al 50% de MIC. Esta

administración de antibiótico se hizo tanto al reactor de manera directa, asegurando una concentración final del 50% de la MIC como al reservorio de caldo de cultivo fresco, observando que en la mayoría de los casos hubo un descenso leve de la población, y una recuperación rápida de la misma. Una vez estable el medio de cultivo a esta concentración de antibiótico, la cual se dio alrededor de las 5 horas, se aumentó la concentración al 75% de la MIC y nuevamente se dejó estabilizar, alcanzando dicho punto alrededor de las 5 horas. Finalizado este periodo la concentración se ajustó a 1MIC y allí se mantuvo por todo el tiempo restante del cultivo continuo.

El día siguiente, pasadas aproximadamente 15 horas de administración del antibiótico a concentración de 1MIC se observaba crecimiento de la población bacteriana luego de un fuerte descenso. Y hacia las 20 horas del inicio de la administración del antibiótico (más de 45 horas de cultivo continuo total) se observaba la estabilización o gran crecimiento del cultivo (Figuras 3-8, 3-9, 3-13, 3-14). Este crecimiento posterior a un fuerte descenso en la población, se consideró un indicativo en la generación de microorganismos mutantes, ya que los microorganismos inicialmente sensibles morían por exposición al antibiótico, pero luego lograron adaptarse al medio, replicándose y volviendo a tener una población masiva y estable en el tiempo (Feng et al., 2014; Feng et al., 2016; Lee et al., 2010; Tonoyan et al., 2019; Spagnolo et al., 2016). Lo anterior, fue confirmado con la medida de las MIC, las cuales luego de ese descenso siempre fueron mayores en comparación con las muestras tomadas antes de este punto (Figuras 3-10, 3-11, 3-12, 3-15, 3-16 y 3-17).

Los resultados encontrados son coherentes con lo reportado en literatura (Feng et al., 2014; Feng et al., 2016; Lee et al., 2010; Tonoyan et al., 2019; Spagnolo et al., 2016), ya que era de esperarse que tras una exposición continua del microorganismo a dosis por debajo de la MIC se generara la adaptación de este al medio mediante la mutación y resistencia al antibiótico. Por ejemplo, tras exposición continua a estreptomicina de *E. coli* cepa DD1953 sensible se lograron obtener mutantes de resistencia con valores de MIC mucho mayores a los valores iniciales con 96 horas de cultivo continuo (Spagnolo et al., 2016). También se ha reportado la generación de microorganismos resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, posteriores a exposición continua a meropenem o ceftazidima de hasta 7 días observando cambios en el valor de la MIC en un factor de 10 a 10,000 dependiendo del antibiótico y protocolo evaluado (Feng et al., 2016).

Con la herramienta propuesta en este trabajo de investigación, manteniendo las condiciones indicadas en los resultados y la metodología de cultivo continuo (ver secciones 2.7 y 3.3) se logró la generación de microorganismos mutantes, resistentes a Piperacilina/ Tazobactam hasta 32 veces más que las iniciales tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, con el desarrollo del cultivo continuo por aproximadamente 55 horas, de las cuales más o menos 40 horas correspondieron a exposición antibiótica, lo que es un tiempo relativamente corto en comparación otros estudios en los que para obtener resistencias han indicado tiempos de cultivo continuo que van 96 h (Spagnolo et al., 2016), pasando por hasta 7 días (Feng et al., 2016) con producción de biomasa de aproximadamente la capacidad del reactor (microorganismos resistentes) (Feng et al., 2016; Spagnolo et al., 2016).

La obtención de este tipo de microorganismos puede resultar de gran interés en diversas aplicaciones como podría ser el desarrollo de nuevas tecnologías antibióticas para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos resistentes, la obtención de enzimas responsables de proveer resistencia al microorganismo, las cuales podrían ser empleadas tanto en el ámbito de investigación como industrial o para estudios sobre resistencia bacteriana que serían de gran importancia considerando el impacto y gravedad que esta representa en la salud pública a nivel mundial (OMS 2016, 2020a, 2020b, 2020c).

Con respecto a la evaluación del perfil de resistencia, es interesante observar los valores obtenidos. Los resultados indican que probablemente el desarrollo de resistencia a Piperacilina/Tazobactam por parte los microorganismos evaluados (*E. coli* y *S. aureus*), podría brindarles resistencia a otros antibióticos incluso de familias distintas (Tablas 3-3 y 3-4).

Revisando cada antibiótico se comparó el valor de la MIC obtenido experimentalmente con los valores reportados para considerar los microorganismos sensibles o resistentes (resumidos en la tabla 4-1) y se obtuvo que, empezando por ceftazidima para *E. coli* que pasó de valor de MIC de 8 µg/mL (sensible) a valores de hasta 256 µg/mL (resistente). Para el *S. aureus* se vió que paso de 16 µg/mL a 512 µg/mL, y aunque 16 µg/mL no se considera un valor sensible tampoco indica resistencia. No obstante, al observar un

cambio tan grande en la MIC, se considera que sí existe una generación de resistencia frente a este antibiótico por parte del *S. aureus*.

Tabla 4-1: MIC antibióticos evaluados (CLSI, 2020; Schumacher et al., 2007).

Antibiótico	MIC sensible (µg/mL)	MIC resistente (µg/mL)	Tipo de antibiótico
Piperacilina/ Tazobactam	≤16/4 ^a ≤8/4 ^b	≥128/4 ^a ≥16/4 ^b	β-lactámico (peniclina-cebador)
Ceftazidima	≤8	≥32	Cefalosporina tercera generación
Meropenem	≤4	≥16	Carbapenémico
Ertapenem	≤2	≥8	Carbapenémico
Cefepime	≤8	≥32	Cefalosporina cuarta generación
Gentamicina	≤4	≥16	Aminoglucósido
Ciprofloxacina	≤1	≥4	Fluoroquinolona
Vancomicina	≤4	≥32	Glucopéptido
Linezolid	128 ^a		2-oxazolidona
	≤4 ^b	≥8 ^b	

^aAplica solo para *E. coli*; ^bAplica solo para *S. aureus*.

Para el meropenem evaluado frente a la *E. coli*, presentaron valores de la MIC que no pasaron a ser resistentes (de 0 µg/mL a 2 µg/mL o 4 µg/mL) y aunque hay un cambio este no es suficiente como para considerarla resistente a este antibiótico, se recomendaría realizar más ensayos de determinación de la MIC para este resultado ya que al ser una valoración preliminar pueden obtenerse resultados más precisos si se hacen más ensayos. Con respecto al *S. aureus*, se observó un cambio en la MIC que pasó de 2 µg/mL (sensible) a 16 µg/mL (resistente)

En relación con el ertapenem, tanto para *E. coli* (pasó de 0 µg/mL a 8 µg/mL o 16 µg/mL) como para *S. aureus* (pasó de 2 µg/mL a 16 µg/mL) se observaron cambios de la MIC que indicaban la generación de resistencia frente a este antibiótico. Situación similar que se observó para el cefepime para los dos microorganismos ya que *E. coli* pasó de 0 µg/mL a 16 µg/mL o 32 µg/mL y *S. aureus* pasó de 8 µg/mL a 64 µg/mL, por lo que se observa la generación de resistencia a este antibiótico.

Los resultados son coherentes si se tiene en cuenta los mecanismos de acción de los antibióticos evaluados, ya que se vio un aumento en la MIC medida para los dos

microorganismos frente a los antibióticos cuyo mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la síntesis de pared por inhibición de las PBP's como es el caso de ceftazidima, meropenem, ertapenem y cefepime (Abdelraouf et al., 2020; Calvo y Martínez, 2009; Chapman y Perry, 2003; Gobernado, 2010; Lagacé-Wien et al., 2014; Morales, 2003; Shirley, 2018; Zhanel et al., 2013). Lo anterior, era esperable tomando en cuenta el mecanismo de acción de la piperacilina/ tazobactam (Abdelraouf et al., 2020) y los mecanismos de resistencia que se han descrito para este antibiótico como son: reducción en la expresión de porinas de membrana externa, expulsión por bombas de eflujo y, con mayor frecuencia, la expresión de β -lactamasas para las cuales tazobactam exhibe poca o ninguna actividad inhibidora (Abdelraouf et al., 2020; Santos et al., 2010; Schechter et al., 2018).

Por otro lado, los resultados obtenidos para los antibióticos con mecanismo de acción distinto al de la piperacilina/tazobactam fueron muy interesantes. Empezando por la gentamicina, que actúa a nivel de la inhibición de la síntesis proteica, mediante la fijación a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Calvo y Martínez, 2009; Molina et al., 2009), la cual no presentó ningún cambio en ninguno de los microorganismos mutados. Ya que la MIC se mantuvo en promedio tanto para *E. coli* como para *S. aureus* en 2 $\mu\text{g/mL}$ que se considera sensible (CLSI, 2020). Por lo que se podría concluir preliminarmente que el mecanismo de resistencia de los dos microorganismos no interviene con las estructuras sobre las que gentamicina tiene acción.

Se observa, respecto a la ciprofloxacina, una fluoroquinolona, que interviene en el proceso de enrollamiento/desenrollamiento del ADN por inhibición de ADN girasa o topoisomerasa IV (Calvo y Martínez, 2009; Leyva y Leyva, 2008), que mostró cambios en la MIC que correspondían a valores de MIC resistente para los dos microorganismos mutantes evaluados. Para *E. coli* se pasó de una MIC de 4 $\mu\text{g/mL}$ (resistente) a 64 $\mu\text{g/mL}$ (resistente) y aunque el valor inicial obtenido ya indicaba un valor de resistencia, el valor que se generó es mucho más alto que el inicial por lo que se considera que hay un efecto sobre este antibiótico. Con respecto al *S. aureus* pasó de 2 $\mu\text{g/mL}$, que no se considera sensible, pero tampoco es tan alto como para considerarlo resistente, a 8 $\mu\text{g/mL}$ que se considera resistente. Por lo que, de nuevo, se podría inferir que hay un efecto sobre la acción de este antibiótico.

Posteriormente, al observar lo obtenido para vancomicina, glucopéptido que actúa en la inhibición de la síntesis de pared celular por inhibición de la polimerización del peptidoglicano, impidiendo la transferencia del disacárido pentapéptido unido al transportador lipídico (Calvo y Martínez, 2009; Garza Velasco et al., 2003), se observa que en *S. aureus* no hubo cambios, mantuvo siempre valores de MIC sensible. Sin embargo, para la *E. coli* sí se obtuvieron valores de MIC resistentes para la mutante. La MIC pasó de 4 µg/mL (sensible) a valores de hasta 32 µg/mL (resistente).

Finamente, para linezolid, 2-oxazolidona que genera la inhibición de la síntesis proteica, ya que se fija a la subunidad ribosómica 50S, en el centro peptidiltransferasa dentro del ARN ribosómico 23S (dominio V), distorsionando así el punto de unión del formilmetionil-ARNt y evitando la formación del complejo de iniciación (Armengol et al., 2020; Clemett y Markham, 2000; Schumacher et al., 2007), se observa, como se esperaba, que en *E. coli* desde el comienzo la actividad fue casi nula (MIC de 256 µg/mL), tal como se indica en literatura (Schumacher et al., 2007), mientras que para *S. aureus* se ve el cambio de MIC de sensible (4 µg/mL) a resistente (8 µg/mL) de acuerdo con los valores encontrados en los ensayos realizados.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Se estableció un cultivo continuo al 50% de la velocidad específica de crecimiento obteniendo un cultivo estable en producción de biomasa de microorganismos.
- Con la herramienta propuesta, se logró la generación de microorganismos mutantes, resistentes a Piperacilina/ Tazobactam hasta 32 veces más que las iniciales tanto para *E. coli* ATCC 25922 como para *S. aureus* ATCC 29213.
- Con el desarrollo del cultivo continuo por aproximadamente 55 horas, de las cuales más o menos 40 horas correspondieron a exposición antibiótica, se lograron obtener los microorganismos mutantes de resistencia.
- Con base en la revisión preliminar del perfil de resistencia se observa resistencia cruzada a otros antibióticos diferentes al empleado en el desarrollo del cultivo continuo, incluso antibióticos que no intervienen con el mecanismo de acción de Piperacilina/Tazobactam.

5.2 Recomendaciones

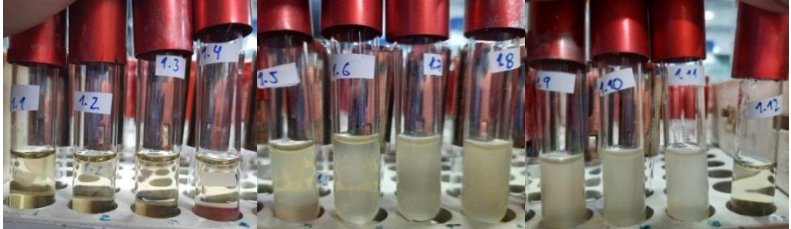

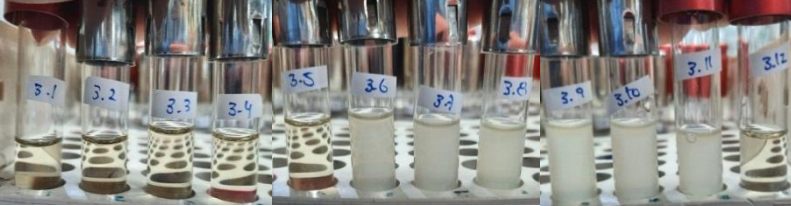

Para posteriores investigaciones se sugiere:

- La revisión de cuál es el mecanismo exacto mediante el que los microorganismos se hicieron resistentes al antibiótico bajo evaluación, por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular.
- Adicionalmente, se consideraría importante también realizar ensayos adicionales para la evaluación del perfil de resistencia frente a otros antibióticos que se haya podido dar, por ejemplo, como la revisión preliminar que se presentó en este trabajo de investigación, empleando antibióticos y una cantidad de ensayos adicionales.

A. Anexo: Evaluación de la MIC de las muestras de cultivo continuo de *Escherichia coli*

Resultados de los ensayos realizados a las muestras tomadas de los ensayos de cultivo continuo de *E. coli*.

Tabla 5-1: MIC en medio líquido medida en muestras de cultivo continuo 1.

Muestra (hora de muestra (h))	Concentración Mínima Inhibitoria	
1 (15h)		8 µg/mL
2 (21 h)		8 µg/mL
3 (27 h)		4 µg/mL
4 (29 h)		4 µg/mL

5 (45 h)		Mayor de 64µg/mL
5p (51 h)		Mayor de 64µg/mL
7p (53 h)		Mayor de 64µg/mL

Tabla 5-2: MIC en medio líquido (concentración modificada) medida en muestras de cultivo continuo 1.

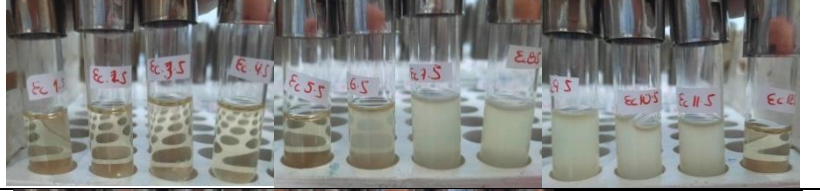
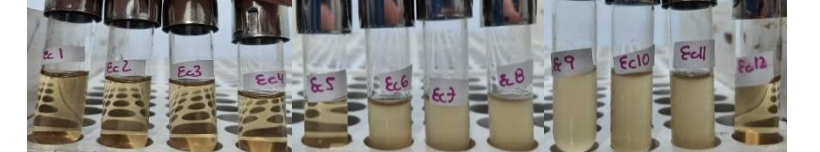
Muestra (hora de muestra (h))	Concentración Mínima Inhibitoria	
5 (45 h)		128 µg/mL
5p (51 h)		128 µg/mL
7p (53 h)		128 µg/mL

Tabla 5-3: Valoración de la resistencia en medio sólido de muestras de cultivo continuo 1.

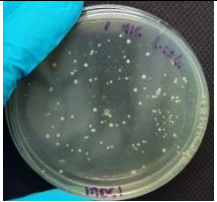
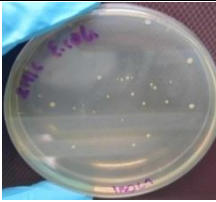
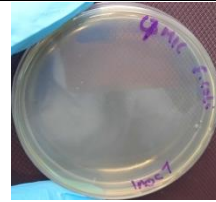
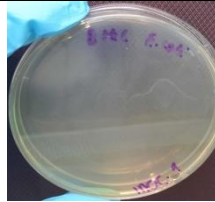



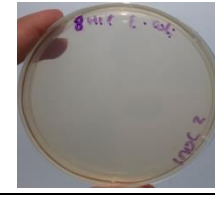


















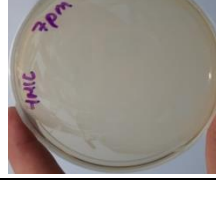
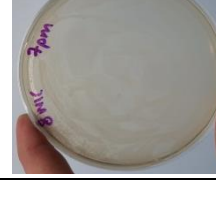
Muestra	1MIC	2MIC	4MIC	8MIC
1				
2				
3				
4				
5				
5p				
7p				

Tabla 5-4: MIC en medio líquido medida en muestras de cultivo continuo 2.

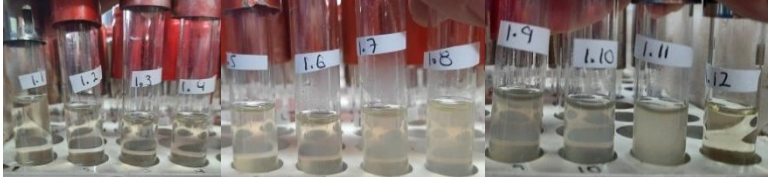
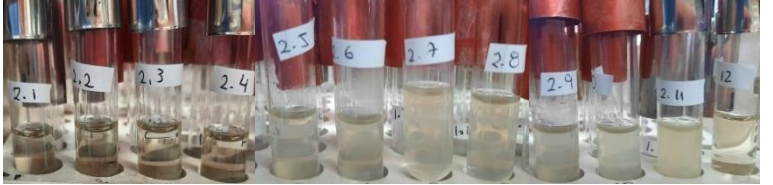



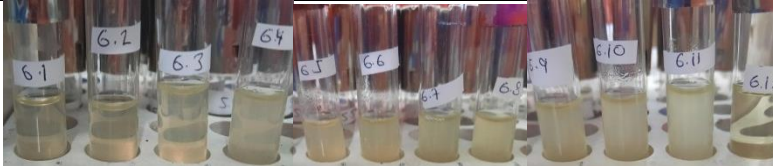
Muestra (hora de muestra (h))	Concentración Mínima Inhibitoria	
1 (16 h)		8 µg/mL
2 (22 h)		8 µg/mL
3 (27 h)		8 µg/mL
4 (44 h)		Mayor de 64µg/mL
5 (50 h)		Mayor de 64µg/mL
6 (62 h)		Mayor de 64µg/mL

Tabla 5-5: MIC en medio líquido (concentración modificada) medida en muestras de cultivo continuo 2.




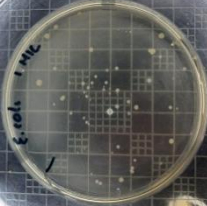
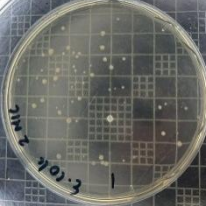
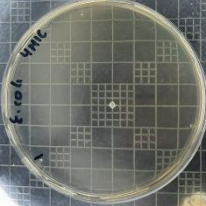
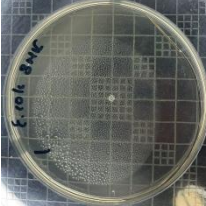
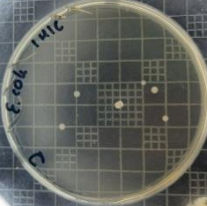
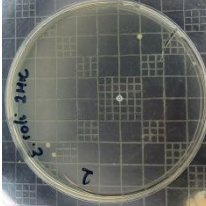
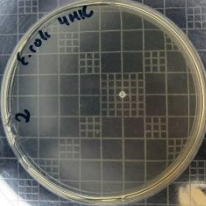
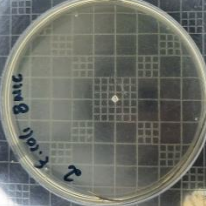
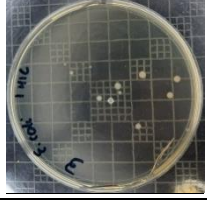

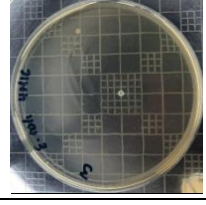
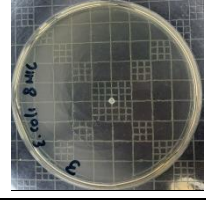
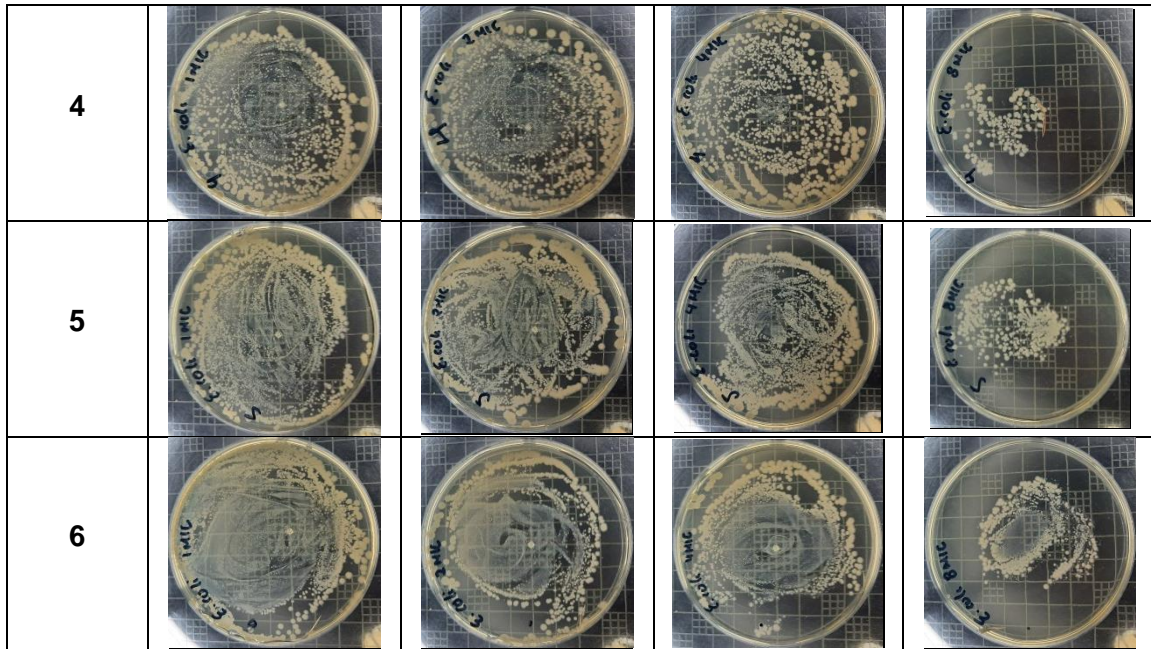
Muestra (hora de muestra (h))	Concentración Mínima Inhibitoria	
4 (44 h)		256 µg/mL
5 (50 h)		256 µg/mL
6 (62 h)		256 µg/mL

Tabla 5-6: Valoración de la resistencia en medio sólido de muestras de cultivo continuo 2.

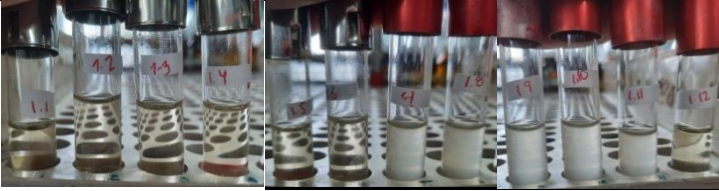


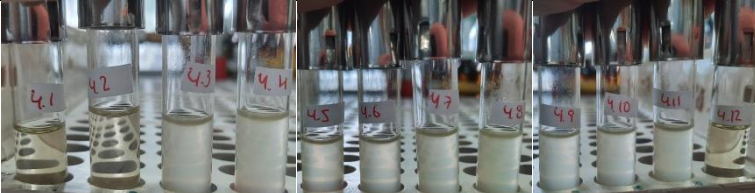
Muestra	1MIC	2MIC	4MIC	8MIC
1				
2				
3				



B. Anexo: Evaluación de la MIC de las muestras de cultivo continuo de *Staphylococcus aureus*

Resultados de los ensayos realizados a las muestras tomadas de los ensayos de cultivo continuo de *S. aureus*.

Tabla 5-7: MIC en medio líquido medida en muestras de cultivo continuo 1.

Muestra (hora de muestra (h))	Concentración Mínima Inhibitoria	
1 (18 h)		2 µg/mL
2 (23 h)		4 µg/mL
3 (28 h)		4 µg/mL
4 (42 h)		32 µg/mL

5 (50 h)		32µg/mL
----------	--	---------

Tabla 5-8: Valoración de la resistencia en medio sólido de muestras de cultivo continuo 1.


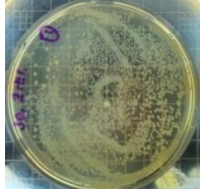
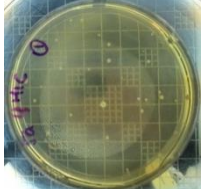
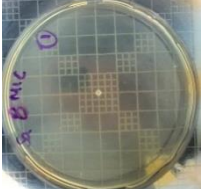
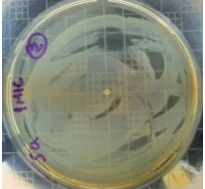
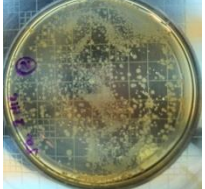
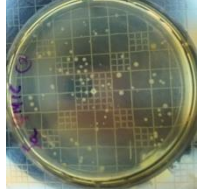
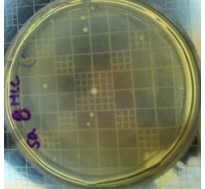
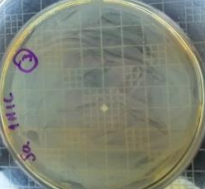

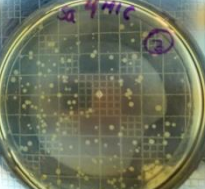
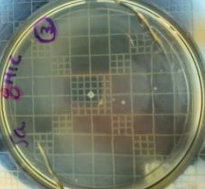
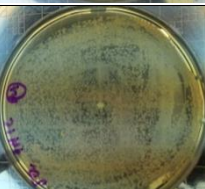
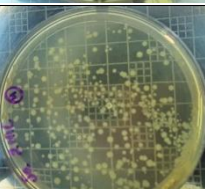
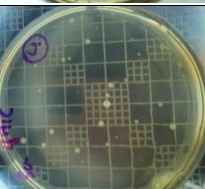
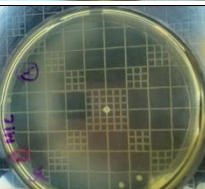

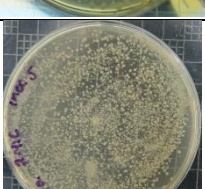
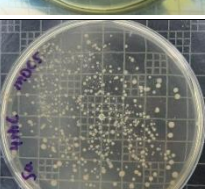
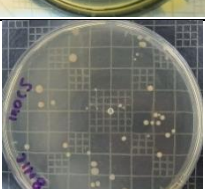
Muestra	1MIC	2MIC	4MIC	8MIC
1				
2				
3				
4				
5				

Tabla 5-9: MIC en medio líquido medida en muestras de cultivo continuo 2.

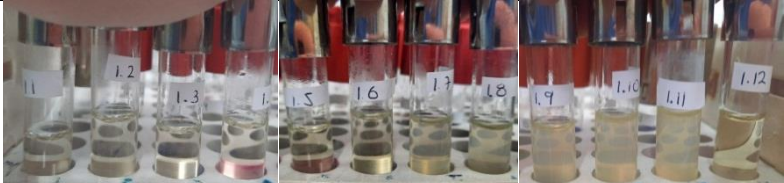
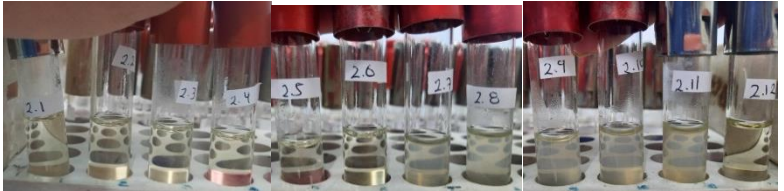
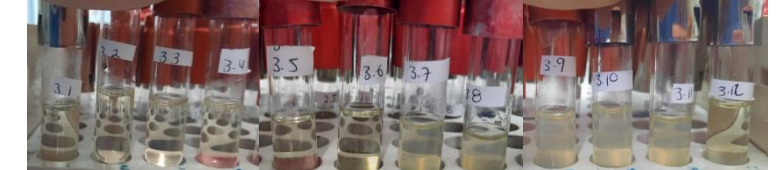
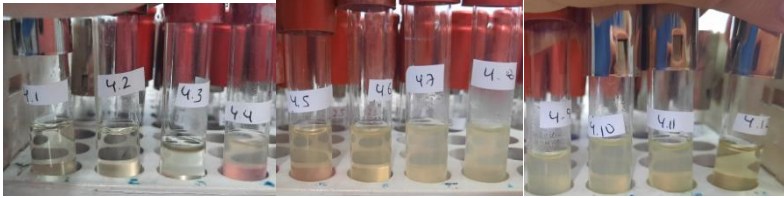
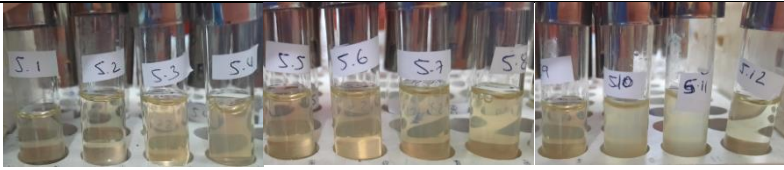
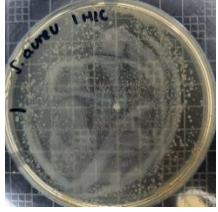
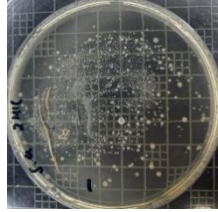
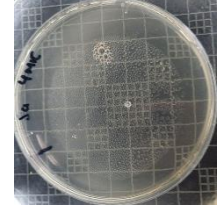
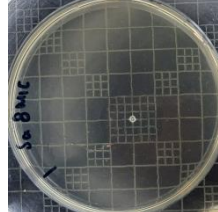

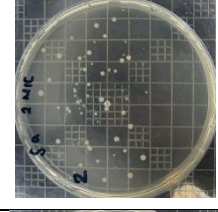
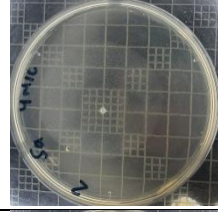
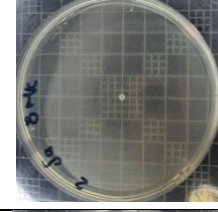


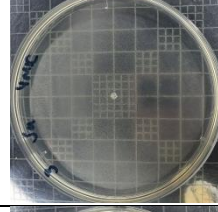
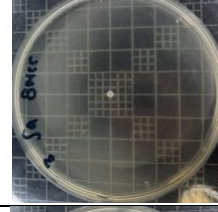
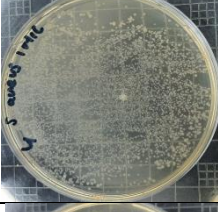
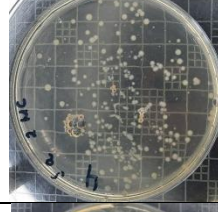

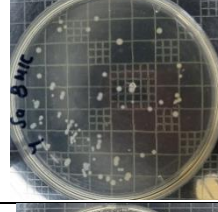
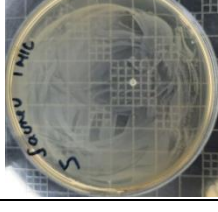
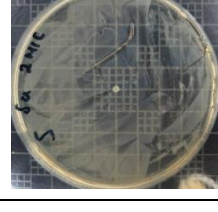
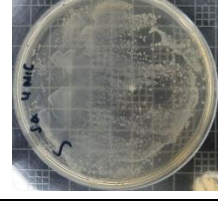
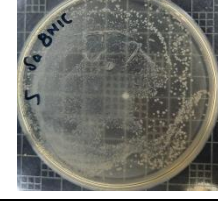
Muestra (hora de muestra (h))	Concentración Mínima Inhibitoria	
1 (14 h)		2 µg/mL
2 (20 h)		2 µg/mL
3 (25 h)		2 µg/mL
4 (43 h)		32 µg/mL
5 (53 h)		32 µg/mL

Tabla 5-10: Valoración de la resistencia en medio sólido de muestras de cultivo continuo 2.

Muestra	1MIC	2MIC	4MIC	8MIC
1				
2				
3				
4				
5				

Bibliografía

- Abdelraouf, K., Chavda, K. D., Satlin, M. J, Jenkins, S. G., Kreiswirth, B. N. y Nicolau, D. P. (2020). Piperacillin-Tazobactam-Resistant/Third-Generation Cephalosporin-Susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates: Resistance Mechanisms and In vitro-In vivo Discordance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105885>
- Armengol, E., Asunción, T., Viñas, M. y Sierra, J. M. (2020). When Combined with Colistin, an Otherwise Ineffective Rifampicin–Linezolid Combination Becomes Active in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 8(86). doi:10.3390/microorganisms8010086
- Barrantes Jiménez, K., Chacón Jiménez, L. y Arias Andrés, M. (2022). El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(2). Doi: 10.15517/psm.v0i19.47590
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F. y Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2), 149-158.
- Calderón Rojas, G. y Aguilar Ulate, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 621, 757-763.
- Calva Mercado, J. J., Castillo, G. y López Vidalb, Y. Actividad de las fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de *Streptococcus pneumoniae* con diferente susceptibilidad a la penicilina: Estudio epidemiológico en cinco ciudades de la República Mexicana. (2005). *Gac Méd Méx*, 141(4), 253-258.
- Calvo, J. y Martínez Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(1), 44–52. doi:10.1016/j.eimc.2008.11.001

- Carey, D. E. y McNamara, P. J. (2015). The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment. *Frontiers in Microbiology. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 5(780). doi: 10.3389/fmicb.2014.00780
- Castañeda M. T. (2019). *Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano* (pp. 19-28). The Legrand Orange Book. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/89651/Apunte_de_c%C3%A1tedra.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Castellano González, M. J., Perozo Mena, A. J., Molero Cubillán, M. J., Montero Araujo, S. C. y Primera Rodríguez, F. J. (2015). Resistencia a la clindamicina inducida por eritromicina en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. *Kasmera* 43(1), 34 - 45.
- Celis Bustos, Y. A., Rubio, V. V. y Camacho Navarro, M. M. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 19(2), 105-117.
- Chapman, T. M. y Perry, C. M. (2003). Cefepime A Review of its Use in the Management of Hospitalized Patients with Pneumonia. *Am J Respir Med*, 2(1), 75-107.
- Clemett, D. y Markham, A. (2000). Linezolid. *Drugs*, 59(4), 815-827.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. MIC testing*. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). *M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. (Edición 30). <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- Dawan, J. y Ahn, J. (2020). Assessment of cross-resistance potential to serial antibiotic treatments in antibiotic-resistant *Salmonella Typhimurium*. *Microbial Pathogenesis*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104478>
- Fariñas, M. C., y Martínez Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(6), 402–409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>

- Feng, Y., Händel, N., Marnix, H. P., Brul, S., Schultsz, C. y Benno, H. (2014). Experimental Simulation of the Effects of an Initial Antibiotic Treatment on a Subsequent Treatment after Initial Therapy Failure. *Antibiotics*, 3, 49-63.
- Feng, Y., Hodiament, C. J., van Hest, R. M., Brul, S., Schultsz, C., y ter Kuile, B. H. (2016). Development of Antibiotic Resistance during Simulated Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in Chemostats. *PLOS one*, 11(2), 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0149310
- Fernández Riverón, F., López Hernández, J., Ponce Martínez, L. M., & Machado Betarte, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1), 44-8.
- Fisher Scientific. (2022a). *BD Medios de cultivo deshidratados Difco™: caldo Mueller Hinton*. Thermo Fisher Scientific. Recuperado en Febrero de 2022 de <https://www.fishersci.es/shop/products/bd-difco-dehydrated-culture-media-mueller-hinton-broth-2/11703503>
- Fisher Scientific. (2022b). *MUELLER-HINTON BROTH*. Thermo Fisher Scientific. Recuperado en Febrero de 2022 de http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0405
- Galán, J. C., Baquero, M. R., Morosini, M. I. y Baquero, F. (2006). Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada. *Infectio*, 10(1), 22-29.
- Garza Velasco, R., Vilchis Gaona, E. G. y Calderón Ozumbilla, F. (2003). Vancomicina y fluoroquinolonas: dos antibióticos que aún conservan su eficacia dentro del oscuro panorama que envuelve a la terapéutica antimicrobiana. *Educación Química*, 14(3), 132-137.
- Gobernado, M. (2010). Meropenem. Aspectos microbiológicos. *Rev Esp Quimioter*, 23(Suppl. 1), 02-17.
- Gómez Ayerbe, C., Vivancos, M. J. y Moreno, S. (2016). Tuberculosis multirresistente: epidemiología actual, esquemas terapéuticos, nuevos fármacos. *Rev Esp Quimioter*, 29(Suppl. 1), 35-38.
- González L. y Cortés J. A. (2014). Revisión sistemática de la farmacorresistencia en enterobacterias de aislamientos hospitalarios en Colombia. *Biomédica. Revista*

del Instituto Nacional de Salud, 34(2), 180-197.
<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1550>

Instituto Nacional de Salud (INS). (2019). *Protocolo de Vigilancia en Salud Pública: Consumo de Antibióticos en el Ámbito Hospitalario*.
https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/PRO_Consumo_de_antibioticos.pdf

Jiménez Morales, F. y Lemos Fernández, M. C. (2001). *Termodinámica: Una guía de clase*. (Capítulo 3). Europa Artes Gráficas S.A.

Lagacé-Wiens, P., Walkty, A. y Karlowsky, J. A. (2014). Ceftazidime–avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Core Evidence*, 9, 13–25.
<http://dx.doi.org/10.2147/CE.S40698>

Lee, H.H., Molla, M. N., Cantor, C.R. y Collins J.J. (2010). Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*, 467(7311), 82-85. doi:10.1038/nature09354.

Leyva, S. y Leyva, E. (2008). Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quím. Méx.*, 2(1), 1-13.

López Pueyoa, M.J., Barcenilla Gaiteb, F., Amaya Villar, R. y Garnacho Monteroc, J. (2010). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Medicina Intensiva*, 35(1), 41-53. doi:10.1016/j.medin.2010.07.011

Lorian, V. (2005). *Antibiotics in Laboratory in Medicine*. (5a ed.). (pp. 91-96 y 114-120). LIPPINCOTT WOLLIAMS & WILKINS.

Molina, J., Cordero, E., Palomino, J. y Pachón, J. (2009). Aminoglucósidos y polimixinas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(3), 178–188. doi:10.1016/j.eimc.2009.02.001

Morales, R. (2003). Ertapenem: Una nueva clase de carbapenem. *Rev Chil Infect*, 20(4), 270-276.

Moreno, C., González, R., y Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2), 185-192. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>

- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L. y Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 648-56.
- Obolski, U., Dellus Gur, E., Stein, G. Y. y Hadanya, L. (2016). Antibiotic cross-resistance in the lab and resistance co-occurrence in the clinic: Discrepancies and implications in *E. coli*. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 155-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.017>
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255204>
- Organización Mundial de la Salud. (01 de junio de 2020a). *Un número sin precedente de países informa tasas preocupantes de resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news/item/01-06-2020-record-number-of-countries-contribute-data-revealing-disturbing-rates-of-antimicrobial-resistance>
- Organización Mundial de la Salud. (13 de octubre de 2020b). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Organización Mundial de la Salud. (2020c). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005587>
- Oromí Durich, J. (2000, diciembre). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*, 36(10), 367-369. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-pdf-10022180>
- Pallares, C. J., y Martínez, E. (2012). Implementación de un programa de uso regulado de antibióticos en 2 unidades de cuidado intensivo medico-quirúrgico en un hospital universitario de tercer nivel en Colombia. *Infectio*, 16(4), 192-198. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123939212700139>
- Paredes, F., y Roca, J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Ámbito Farmacéutico. Farmacología. OFFARM*, 23(3), 116-124. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13059414>

- Quiñones Pérez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3).
- Rayner, C. y Munckhof, W. J. (2005). Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine Journal*, 35, S3-S16.
- Rincón, S., Panesso, D., Díaz, L., Carvajal, L. P., Reyes, J., Munita, J. M. y Arias, C. A. (2014). Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *Biomedica*, 34(01), 191-208. doi:10.1590/S0120-41572014000500022.
- Rocha, C., Reynolds, N. D. y Simons, M. P. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: Una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(1), 139-45.
- Rossi, F., Diaz, L., Wollam, A., Panesso, D., Zhou, Y., Rincon, S., Narechania, A., Xing, G., Di Gioia, T., Doi, A., Tran, T. T., Reyes, J., Munita, J. M., Carvajal, L. P., Hernandez Roldan, A., Brandão, D., van der Heijden, I. M., Murray, B. E., Planet, P. J.,..... Arias, C. A. (2014). Transferable Vancomycin Resistance in a Community- Associated MRSA Lineage. *N Engl J Med*, 370(16), 1524–1531. doi:10.1056/NEJMoa1303359
- Ruiz Garbajosa, P. y Cantón, R. (2016). Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Rev Esp Quimioter*, 29(Supl. 1), 21-25.
- Santos, K. V., Diniz, C. G., Veloso, L. C., Andrade, H. M., Giusta, M. S., Pires, S. F., Santos, A. V., Morais Apolônio, A. C., Roque de Carvalho, M. A. y Farias, L. M. (2010). Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. *Research in Microbiology*, 161, 268-275. doi:10.1016/j.resmic.2010.03.006
- Schechter, L. M., Creely, D. P., Garner, C. D., Shortridge, D., Nguyen, H., Chen, L., Hanson, B. M., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Dunne, W. M., van Belkum, A. y Leopold, S. R. (2018). Extensive Gene Amplification as a Mechanism for Piperacillin- Tazobactam Resistance in *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology*, 9(2), <https://doi.org/10.1128/mBio.00583-18>.

- Shirley, M. (2018). Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*, 78, 675–692. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0902-x>
- Schumacher, A., Trittler, R., Bohnert, J. A., Kümmerer, K., Pagès, J. M. y Kern, W. V. (2007). Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 1261–1264. doi:10.1093/jac/dkl380
- Spagnolo, F., Rinaldi, C., Sajorda, D. R., Dykhuizen, D. E. (2016). Evolution of Resistance to Continuously Increasing Streptomycin Concentrations in Populations of *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology: Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3), 1336-1342.
- Suárez, C., y Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(2), 116-129.
- Tonoyan, L., Fleming, G. T., Friel, R., y O'Flaherty, V. (2019). Continuous culture of *Escherichia coli*, under selective pressure by a novel antimicrobial complex, does not result in development of resistance. *Scientific Reports*, 9(2401), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38925-9>
- Toprak, E., Veres, A., Yildiz, S., Pedraza, J.M., Chait, R., Paulsson, J. y Kishony, R. (2013). Building a morbidostat: an automated continuous-culture device for studying bacterial drug resistance under dynamically sustained drug inhibition. *Nature Protocols*, 8(3), 555-567. doi:10.1038/nprot.2013.021
- Tortora, G. J., Funke, B. R., y Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. (9ª ed.). (pp. 240-245). Editorial Panamericana.
- Villa, L. M., Cortés, J. A., Leal, A. L., Meneses, A. y Meléndez, M. P. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos. *Rev Chilena Infectol*, 30(6), 605-610. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000600005>

- Wua, X., Zhongb, G., Wangc, H. y Zhud, J. (2021). Temporal association between antibiotic use and resistance in Gram-negative bacteria. *Brazilian Journal of Biology*, 83. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.239323>
- Zhanel, G. G., Lawson, C. D., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagace´-Wiens, P. R. S., Denisuk, A., Rubinstein, E., Gin, A. S., Hoban, D. J., Lynch 3rd, J. P. y Karlowsky, J. A. (2013). Ceftazidime-Avibactam: a Novel Cephalosporin/b-lactamase Inhibitor Combination. *Drugs*, 73, 159–177. DOI 10.1007/s40265-013-0013-7
- Zhao, C., Xin, L., Xu, X., Qin, Y. y Wu, W. (2021). Dynamics of antibiotics and antibiotic resistance genes in four types of kitchen waste composting processes. *Journal of Hazardous Materials*, 424. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127526>