

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS**



Trabajo de fin de carrera titulado:

**“EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO”**

Realizado por:

**FRANCIS DAYANA ESPINOSA AGUIRRE**

Director del proyecto:

**Alberto Alejandro Aguirre Bravo, PhD.**

Como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Quito, 11 de octubre del 2022**

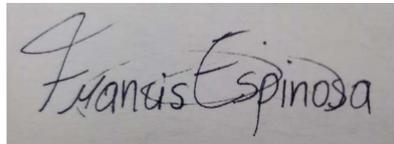
**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, FRANCIS DAYANA ESPINOSA AGUIRRE, con cédula de identidad #176048323 declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

A rectangular box containing a handwritten signature in black ink. The signature is written in a cursive style and reads "Francis Espinosa".

Francis Dayana Espinosa Aguirre

1726048323

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“EVALUACIÓN DE UNA NUEVA TECNOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO DE  
COMUNIDADES BACTERIANAS ANAEROBIAS RESISTENTES A  
ANTIBIÓTICOS Y QUE PRESENTAN ALTAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE  
CRECIMIENTO”**

Realizado por:

**FRANCIS DAYANA ESPINOSA AGUIRRE**

Como Requisito para la Obtención del Título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

ha sido dirigido por el profesor

**ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor.



FIRMA

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

**JOHANNA LUCÍA MEDRANO BARBOZA**

**JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS**

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral

ante el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, de 2022

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

**BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES APLICADOS A LA GESTIÓN  
AMBIENTAL Y LA BIOTECNOLOGÍA**

Y con el financiamiento del

**Proyecto “Nueva tecnología para seleccionar e identificar bacterias con resistencia  
múltiple a antibióticos de última generación”**

A cargo del profesor

**Alberto Alejandro Aguirre Bravo, PhD.**

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**DEDICATORIA**

A mi padre del cielo, Dios por que estuvo, está y siempre estará y los que Él me regalo

A mis abuelitos y bisabuelita, Efraín, Lucía y Rosita porque su recuerdo siempre vivirá en mí

A todos los que hicieron posible que llegará hasta aquí

# **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, indudablemente, a mis padres, Lucía y José, por su apoyo y constante esfuerzo en cada etapa de mi vida y la de mis hermanos.

A mi abuelita, Victoria, por ser mi segunda madre

A mis pequeños primos, Saúl y Sebas, porque siempre encontraron una manera de hacerme sonreír

A Sarita, Gaby y Ali por ser mis amigas y apoyo en los momentos que necesitaba y porque con ellas las risas nunca faltaron

A mis profesores porque su dedicación, empeño y guía fueron y son de ejemplo para el futuro

A mis compañeros de curso porque sin duda cada uno de ellos me dejó una enseñanza

A Don Edu por siempre demostrar amabilidad y gentileza cuando estaba en la universidad

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO  
ÍNDICE GENERAL**

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
METODOLOGÍA .....	9
FASE DE CAMPO.....	9
ETAPA 1. Área de estudio.....	9
1.1. Toma de muestra de agua residual .....	9
FASE EXPERIMENTAL .....	10
ETAPA 2. Implementación de la metodología de detección en el laboratorio .....	10
2.1. Diseño y montaje del proceso de detección .....	10
2.2. Detección de comunidades bacterianas resistentes a antibióticos.....	14
2.3. Análisis Morfológico.....	15
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	15
ETAPA 3. Análisis de la capacidad de la metodología implementada para la detección de comunidades con resistencia a antibióticos.....	15
3.1. Evaluación de índice de susceptibilidad en comunidades bacterianas a diferentes tasas de dilución. ....	15
RESULTADOS .....	16
ETAPA 2. Implementación de la metodología de detección en el laboratorio .....	16
Montaje del proceso de detección .....	16
Detección de comunidades bacterianas resistentes .....	16
Análisis Morfológico.....	19
ETAPA 3. Análisis de la capacidad de la metodología implementada para la detección de comunidades con resistencia a antibióticos.....	20
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES .....	26
RECOMENDACIONES .....	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
ANEXOS.....	32

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO  
ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Representación esquemática de un quimiostato. ....	7
<b>Figura 2</b>	Flujo de trabajo .....	9
<b>Figura 3</b>	Ubicación geográfica de la toma de muestra. ....	10
<b>Figura 4</b>	Diagrama del proceso de detección .....	11
<b>Figura 5</b>	Montaje del quimiostato en el laboratorio .....	16
<b>Figura 6</b>	Índice de susceptibilidad en la tasa de dilución baja .....	17
<b>Figura 7</b>	Índice de susceptibilidad en la tasa de dilución media .....	18
<b>Figura 8</b>	Índice de susceptibilidad en la tasa de dilución alta .....	19
<b>Figura 9</b>	Cultivo de bacterias en medios selectivos .....	20

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b>	Diseño del medio de cultivo mínimo .....	12
<b>Tabla 2</b>	Cantidades de administración en el ensayo de antibióticos .....	14
<b>Tabla 3</b>	Concentraciones de antibióticos .....	32
<b>Tabla 4</b>	Razón O.D e Índice de susceptibilidad en las diferentes tasas de dilución.....	33
<b>Tabla 5</b>	Valores de índice y desviación estándar (D.E) a una tasa de dilución de $0.07h^{-1}$ .....	34
<b>Tabla 6</b>	Valores de índice y desviación estándar (D.E) a una tasa de dilución de $0.4h^{-1}$ .....	35
<b>Tabla 7</b>	Valores de índice y desviación estándar (D.E) a una tasa de dilución de $0.6h^{-1}$ .....	36

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**Para someter a:**

**To be submitted:**

**Francis Dayana Espinosa Aguirre<sup>1</sup>, Alberto Alejandro Aguirre Bravo<sup>1\*</sup>**

**“EVALUACIÓN DE UNA NUEVA TECNOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO”**

<sup>1</sup>Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador. 2022

\*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: PhD Alberto Alejandro Aguirre Bravo

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-963091192; email: [alberto.aguirre@uisek.edu.ec](mailto:alberto.aguirre@uisek.edu.ec)

# **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

## **RESUMEN**

La resistencia a antibióticos generada por el uso, abuso y mal uso de estos medicamentos por parte de la población provoca millones de muertes al año alrededor del mundo. De ahí la importancia por desarrollar métodos de detección que permitan un control y monitoreo adecuado para contrarrestar sus efectos. Los métodos tradicionales de detección de resistencia no permiten estudiar bacterias con altas velocidades específicas de crecimiento ni comunidades bacterianas en masa, su objetivo se ha centrado únicamente en el análisis de cultivos puros o axénicos. Es por ello que se hace imprescindible contar con nuevas metodologías de detección de resistencia a antibióticos. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar una metodología de detección de resistencia en comunidades bacterianas con altas velocidades específicas de crecimiento mediante el uso de un quimiostato seguido por pruebas de susceptibilidad en tubos de ensayo y medición de absorbancia. Para ello se tomaron en cuenta 3 etapas; recolección, implementación y análisis. En la primera se dictaminó como modelo de estudio aguas residuales del río Machángara. La segunda abarcó el diseño de un quimiostato simple de una etapa, trabajando en condiciones anaerobias y a diferentes tasas de dilución para el cultivo de comunidades bacterianas, las mismas que fueron tratadas posteriormente con 6 antibióticos (AMIK, GEN, BIN, AMP, AMX y CRO) de uso común y estudiadas por espectrofotometría. En la tercera etapa se usaron los valores obtenidos para establecer un índice de susceptibilidad, el cual se fijó como superior o igual a uno como una no susceptibilidad. Los resultados indican a comunidades bacterianas anaerobias como no susceptibles a BIN y AMIK en la tasa de dilución baja y alta, y susceptibilidad a todos los antibióticos analizados en la tasa de dilución media. Se concluye entonces la fiabilidad en la implementación de la nueva metodología para evaluar diferentes focos de posible reproducibilidad de bacterias con algún tipo de resistencia a antibióticos.

**Palabras clave:** resistencia, antibióticos, comunidades bacterianas, aguas residuales, quimiostato, índice de susceptibilidad.

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO  
ABSTRACT**

Antibiotic resistance generated by the use, abuse and misuse of these drugs by the population causes millions of deaths a year around the world. Hence the importance of developing detection methods that allow adequate control and monitoring to counteract their effects. Traditional methods of resistance detection do not allow to study bacteria with high specific growth rates or mass bacterial communities, their objective has focused solely on the analysis of pure or axenic cultures. That is why it is essential to have new methodologies for the detection of antibiotic resistance. The present work aims to evaluate a methodology for detecting resistance in bacterial communities with high specific growth rates by using a chemostat followed by susceptibility tests in test tubes and absorbance measurement. For this, 3 stages were taken into account: collection, implementation and analysis. In the first, wastewater from the Machángara River was ruled as a study model. The second included the design of a single-stage simple chemostat, working under anaerobic conditions and at different dilution rates for the culture of bacterial communities, which were subsequently treated with 6 antibiotics (AMIK, GEN, BIN, AMP, AMX and CRO) commonly used and studied by spectrophotometry. In the third stage, the values obtained were used to establish a susceptibility index, which was set as greater than or equal to one as a non-susceptibility. The results indicate anaerobic bacterial communities as not susceptible to BIN and AMIK in the low and high dilution rate, and susceptibility to all antibiotics analyzed in the mean dilution rate. The reliability in the implementation of the new methodology to evaluate different foci of possible reproducibility of bacteria with some type of antibiotic resistance is concluded.

**Keywords:** resistance, antibiotics, bacterial communities, wastewater, chemostat, susceptibility index.

# EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

## INTRODUCCIÓN

A medida que avanzaba el siglo 20 las infecciones bacterianas veían su posible fin con la llegada “revolución de los antibióticos” (Lozano, 2021). La penicilina descubierta en 1928 y el desarrollo de las sulfonamidas en 1937 como los primeros antimicrobianos efectivos, se convertían en herramientas poderosas para tratar infecciones causadas por microorganismos (Davies & Davies, 2010). Desde entonces y hasta ahora el uso, abuso y mal uso de estos y nuevos antibióticos provocarían que varias cepas bacterianas fueran capaces de inactivar al fármaco y transmitir este mecanismo de defensa de generación en generación, desarrollando lo que hoy se conoce como resistencia antimicrobiana (RAM).

La facultad de soportar concentraciones de antibióticos con relevancia clínica sin sufrir ningún tipo de alteración es como habitualmente se define a la resistencia antimicrobiana (Choffnes et al., 2010). Surge de la conjugación de genes que confieren resistencia y se transfieren entre cepas bacterianas, influyendo de esta forma el medio en el que se desarrollan. Es común asociarla con una amplia gama de mecanismos bioquímicos de los cuales se destacan; la producción de enzimas hidrolíticas como las  $\beta$ -lactamasas, la modificación del sitio activo por metilación del adn o alteración de un aminoácido, la impermeabilidad de la membrana plasmática por cambios en el diámetro o número de porinas y bombas de eflujo o expulsión que no permiten la acción del antimicrobiano. El desconocimiento de estos mecanismos complica el control efectivo y prevención del desarrollo de la resistencia (Moreno M., et al., 2009; Davies & Davies, 2010).

Un ejemplo claro en la diseminación de la resistencia se encuentra en *Staphylococcus aureus* cuyas infecciones en el ser humano se trataron con penicilina efectivamente a principios de los años 40, pero años más tarde ya se encontraban cepas resistentes. Hoy en día la penicilina solo es útil para acabar con menos del 10% del microorganismo, reportándose así una

## **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

resistencia al fármaco del 93% o más en cepas aisladas de hospitales (Castellano G., & Perozo-Mena, 2010).

En el mundo, se estima que al año más de 1.3 millones de personas mueren a causa de infecciones por bacterias con algún tipo de resistencia a antibióticos. De seguir así la OMS ha declarado que para el año 2050 el progreso de la resistencia a antibióticos podría matar a 10 millones de personas por año, haciéndola aún más peligrosa que enfermedades como la tuberculosis, el cáncer, la diabetes o incluso el VIH/SIDA y afectando mayoritariamente la economía de países en vías de desarrollo (Vesper, 2019).

Como respuesta a la problemática que enfrenta el planeta respecto a la resistencia antimicrobiana, la OMS en conjunto con jefes de estado lideran múltiples actividades en torno a la prevención, concientización, vigilancia, investigación y desarrollo de antibióticos (OMS, 2020). En América Latina a finales de los años 90 se concibieron los proyectos Artemis y Resist Net como estudios de vigilancia de patrones de resistencia a diversos antimicrobianos para la creación de una gran base de datos confiable (Grupo Colaborativo Resist Net, 2000). Así mismo desde 2010, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) implementaron el proyecto “Trabajando juntos para combatir la resistencia a los antimicrobianos” en el enfoque de *Una Salud*, donde son participes 5 países latinoamericanos (OPS, 2018).

En este contexto y desde que fue detectado por primera vez en 2010 una resistencia en *Klebsiella pneumoniae*, el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2019), preparó el Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana 2019-2023 impulsando un buen control y uso responsable de antimicrobianos en diferentes sectores productivos del país (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2019).

## **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

Dentro de los métodos de determinación de resistencia se encuentran aquellos de carácter fenotípico como el de difusión en disco (antibiogramas), uno de los más usados por su sencillez, versatilidad y bajo costo, sin embargo, sus resultados son de tipo cualitativo y no permite una lectura directa de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), además no son útiles en la detección de nuevos mecanismos de resistencia como la producción de  $\beta$ -lactamasas o alta resistencia a los aminoglucósidos (Tenover F.C, & Mohammed J.M., 2000).

También se tiene al E-test, sencillo y con una medición directa, pero de alto costo. En los métodos de dilución se tiene al de dilución en agar y el de dilución en caldo usados como referencia para la determinación de la CMI, pero al practicarlos resultan complejos. Todos estos son métodos estandarizados y como tal han sido diseñados para un inóculo bacteriano de una sola cepa (Martínez C & Porras G, 2021).

Otros métodos son los de carácter genotípico, donde se involucran pruebas de biología molecular, inmunocromatografía, microarrays, entre otros, cuyo fin es el de encontrar genes o mutaciones asociadas a resistencias bacterianas o incluso para detectar incoherencias en las pruebas de CMI. Estas pruebas tienen como desventaja su alto costo y complicado control (Tenover F.C, & Mohammed J.M., 2000). Se mencionan también nuevas tecnologías como el sistema automatizado VITEK, que permite identificación de bacterias y levaduras y estudios de sensibilidad microbiana (Romeua et al., 2010). Es comúnmente utilizado para validación de datos, es de fácil reproducibilidad, rápida, comparable y tiene buena relación efectividad-costo (Gerst J.T., 2000).

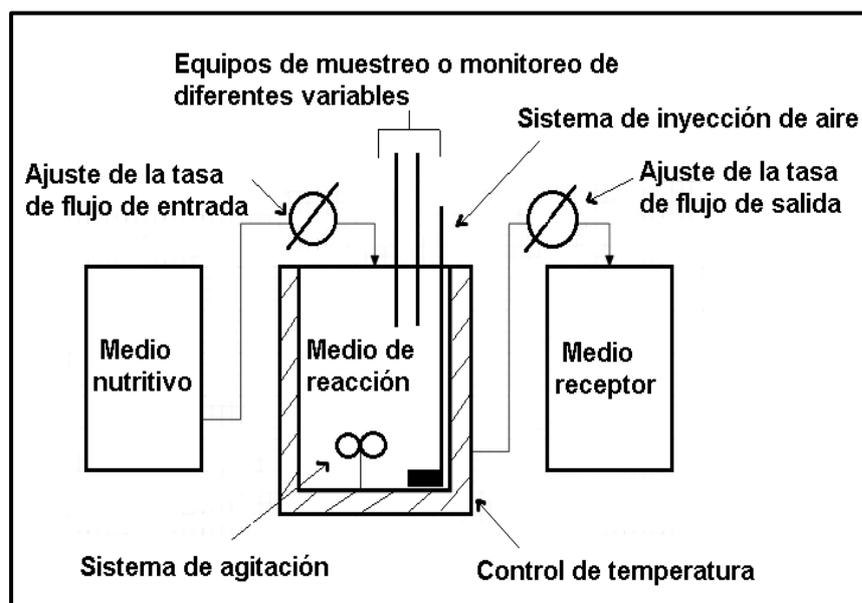
Todos los métodos anteriormente mencionados no permiten detectar bacterias con altas velocidades específicas de crecimiento y resistentes a antibióticos, tampoco ofrecen la posibilidad de estudiar en masa a comunidades bacterianas. Una alternativa donde se tome en cuenta estos escenarios es el uso de un quimiostato acompañado de pruebas de sensibilidad con tubos de ensayo y medición de absorbancia. Estos ofrecen en conjunto, un ambiente propicio

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

para el crecimiento de microorganismos provenientes de fuentes de contaminación con desarrollo potencial de resistencia, como por ejemplo aguas residuales y la aplicación de un tratamiento con diferentes antibióticos que estarán en contacto directo con las bacterias y cuya respuesta se observa por espectrofotometría, siendo esta última una de las técnicas más comunes para monitorear el crecimiento microbiano.

Inventado en la década de 1950, el quimiostato es un dispositivo que contiene un medio nutritivo, puede funcionar de manera continua y permite el estudio de las propiedades de crecimiento microbiano a partir de un nutriente denominado "limitante" y otros recursos básicos. Dentro de sus características se encuentra que su contenido permanece homogéneo y su volumen constante, debido a la incorporación de aplicativos que aseguran idénticos flujos de entrada como de salida, tal como visualiza en el esquema de la Figura 1. Su importancia y relevancia en la investigación radica en que ofrece la posibilidad de ajustar la velocidad de crecimiento de los microorganismos que crecen en el interior, manipulando la velocidad de alimentación (Harmand J., & Lobry C., et al., 2021).

**Figura 1** Representación esquemática de un quimiostato.



*Nota.* Tomado de Harmand J., & Lobry C., et al., 2021.

## **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

Las aguas residuales contaminadas principalmente por coliformes fecales y totales, así como detergentes, aceites, grasas y otros residuos agrícolas, químicos y farmacéuticos, constituyen un problema fundamental para la salud pública al considerarse como nichos con potencial desarrollo de resistencia y otras enfermedades (Naturales et al., 2021). De ahí su importancia en esta investigación. Un reservorio de este tipo de contaminación lo constituye el río Machángara cuya contaminación impiden el aprovechamiento del fuerte desnivel de sus recorridos como fuente de riego en la agricultura o para uso doméstico, pero servirá como modelo de estudio en el presente trabajo.

Por lo expuesto anteriormente, cómo hipótesis de trabajo *se busca que la nueva metodología de detección basada en el uso de un quimiostato simple de una etapa seguido de una serie de pruebas donde se pone en contacto el caldo de bacterias cultivado con los antibióticos, permitirá encontrar comunidades bacterianas con altas velocidades específicas de crecimiento resistentes a antibióticos.*

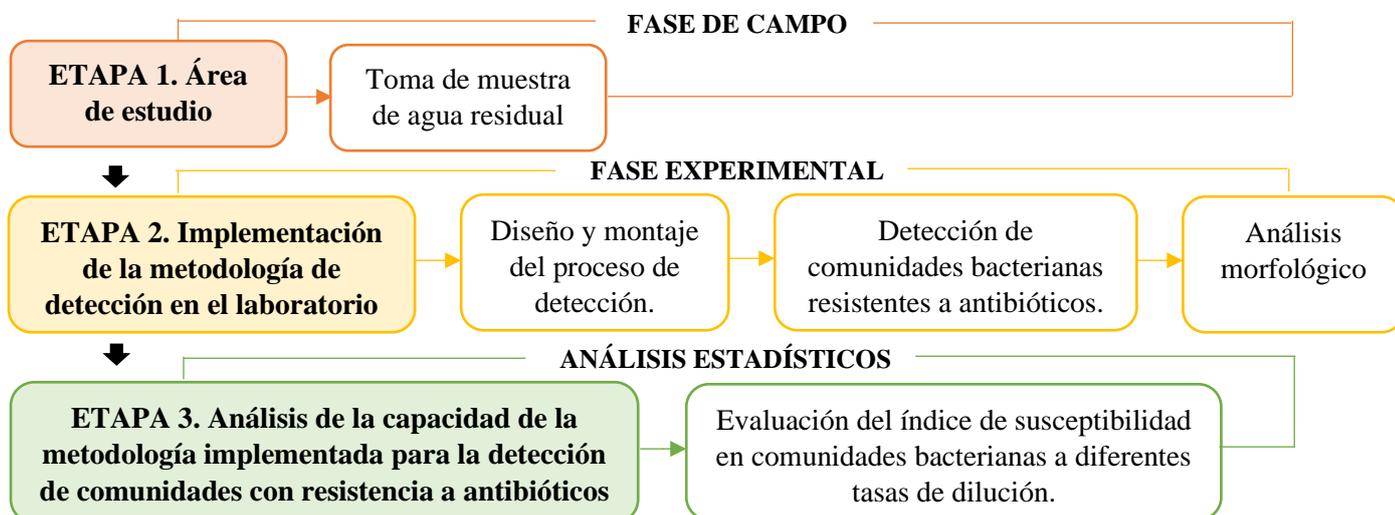
De este modo, se estableció como objetivo general evaluar una nueva metodología de detección de comunidades bacterianas con altas velocidades específicas de crecimiento y que presenten resistencia a antibióticos a través del uso de un quimiostato seguido de pruebas de contacto entre caldo de cultivo y antibióticos. Los objetivos específicos fueron (1) implementar un quimiostato para el crecimiento de comunidades bacterianas recolectadas del río Machángara seguido de una etapa de pruebas con antibióticos utilizando lectura de densidad óptica y (2) analizar si la metodología implementada es adecuada para la detección de comunidades bacterianas que presenten altas velocidades específicas de crecimiento y sean resistentes a antibióticos.

# EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

## METODOLOGÍA

En el presente estudio se siguió la secuencia de trabajo que se indica en la Figura 2.

Figura 2 Flujo de trabajo



### FASE DE CAMPO

#### ETAPA 1. Área de estudio

##### 1.1. Toma de muestra de agua residual

El río Machángara nace en la vertiente del cerro Atacazo al suroccidente de Quito, recorre la ciudad hasta finalmente atravesar las montañas cerca de Guápulo y salir al valle de Cumbayá (Espinosa, 2019). Es uno de los afluentes más importantes y cuenta con 22.5Km de longitud (Campaña et al., 2017). Si bien su caudal en la antigüedad servía para riego y recreación, hoy en día su alta contaminación derivada del 76% de las descargas de aguas residuales que recibe del sector urbano e industrial, hace imposible darle el mismo uso. Considerando lo anterior, es inevitable no pensar en que en este medio se desarrollen con efectividad bacterias anaerobias con algún tipo de resistencia a antibióticos de uso común. Por consiguiente, sus aguas se tomaron como modelo de estudio en el presente trabajo.

La toma de muestra en el río se realizó en el sector de “El Recreo” en el Parque Lineal Machángara al sur de Quito, en las coordenadas 0°15'04.1" S 78°31'29.2" W (figura 3a). Se colectó el agua residual en una botella de plástico de 500ml de capacidad, previamente

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

desinfectada con agua y alcohol, a una profundidad de 20cm por debajo de la superficie del río y cerca de la orilla (figura 3b). Luego de esto se guardó en la nevera a 4°C para su posterior uso como inóculo del quimiostato.

**Figura 3** Ubicación geográfica de la toma de muestra.



*Nota.* En la figura se muestra en (a) Imagen satelital del río Machángara (Google Maps, 2013) y (b) Imagen digital del río Machángara en el punto de recolección del agua residual.

### FASE EXPERIMENTAL

#### ETAPA 2. Implementación de la metodología de detección en el laboratorio

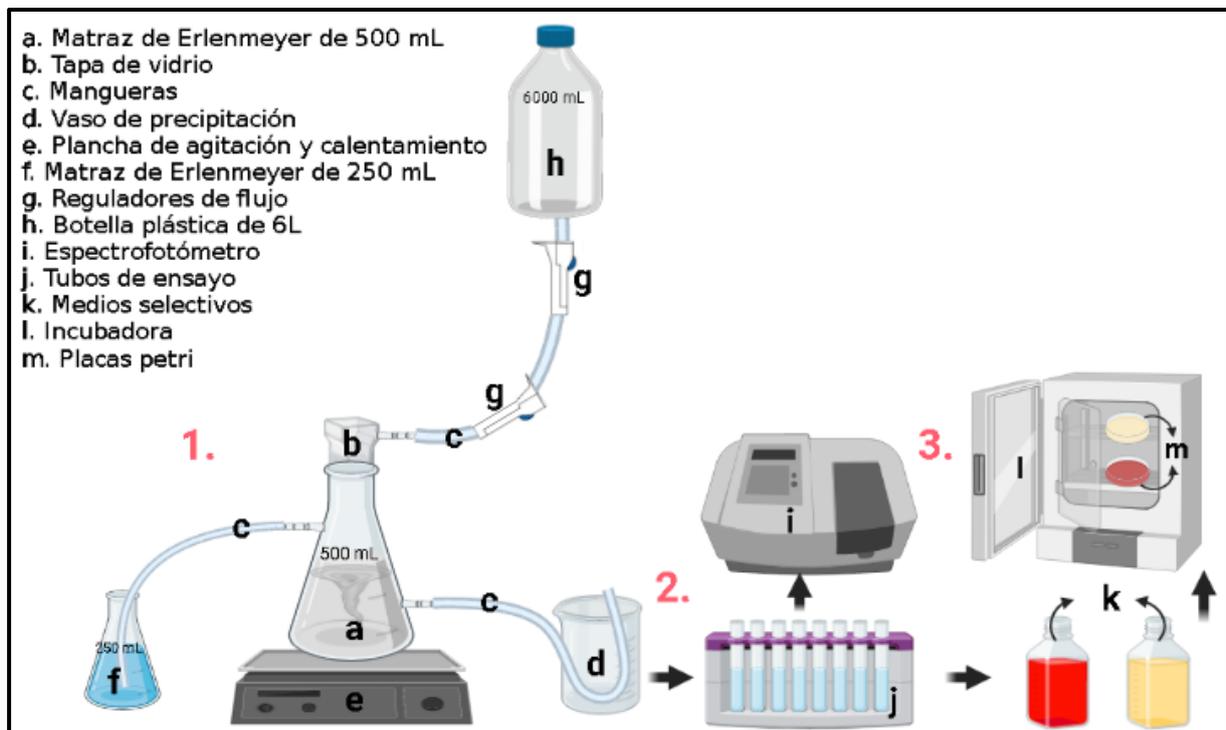
##### 2.1. Diseño y montaje del proceso de detección

En la metodología a implementar se diseñó un quimiostato simple de una etapa, el cual trabajó en condiciones anaerobias. Dentro de las partes que lo formaron se encontraba; un matraz de Erlenmeyer de 500ml de capacidad con dos tubuladuras laterales (una superior y otra inferior de cada lado), para salida de gases y de excesos respectivamente, una tapa de vidrio con una tubuladura lateral para la alimentación y tres mangueras de 30cm de longitud, dos de tipo pecera y una industrial de ¼ de pulgada. Las dos primeras mangueras se conectaron, una a la tubuladura lateral superior del matraz y otra a la tubuladura de la tapa. La manguera industrial

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

se conectó a la tubuladura lateral inferior del matraz y se dirigió a un vaso de precipitación que sirvió como contenedor de desechos. El matraz se colocó sobre una plancha de agitación y calentamiento que se mantuvo a 30°C y 240rpm. Además, se usó como desinfectante un matraz de Erlenmeyer de 250ml de capacidad con una solución de sulfato cúprico, donde se insertó la manguera de la tubuladura lateral superior del matraz. Se añadieron 2 reguladores de flujo en la manguera de la tapa que se fijó en una botella plástica de 6l de capacidad, donde se colocó el medio para el cultivo continuo. Cada uno de los componentes mencionados y su respectiva ubicación se muestran en la Figura 4.

**Figura 4** Diagrama del proceso de detección



*Nota.* En la figura se representa el proceso de detección que se siguió en el laboratorio: 1. Diseño de quimiostato para cultivo de comunidades bacterianas, 2. Ensayo con antibióticos y medición de absorbancia y 3. Análisis morfológico con medios selectivos. Creado con BioRender.com

El montaje del quimiostato en el laboratorio se realizó por duplicado y siguiendo las instrucciones mencionadas anteriormente y se instaló en las repisas del Laboratorio de Ing. Ambiental en la Universidad Internacional SEK. Las posteriores pruebas para la detección de

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

resistencia a antibióticos se llevaron a cabo en conjunto en los laboratorios de Microbiología y Química.

Para determinar el crecimiento de poblaciones bacterianas y mantener los principios de conservación de masa y energía se diseñó también un medio de cultivo mínimo. Esto, siguiendo las directrices establecidas por Acevedo *et al.*, (2002) y utilizando la ecuación (1) y (2). Los valores de los nutrientes con los que se trabajó se muestran en la Tabla 1.

$$S_0 = S_f + \frac{X_f - X_0}{Y_{x/s}} \quad (1)$$

$$Y_{x/s} = \frac{\% \text{ elemento en el nutriente}}{\% \text{ elemento en biomasa}} \quad (2)$$

Donde:

$S_0$ : Concentración inicial del nutriente

$S_f$ : Concentración final del nutriente ( $S_f = 0$ )

$X_f$ : Concentración final de los microorganismos en el cultivo ( $X_f = 2 \text{ g/L}$ )

$X_0$ : Concentración inicial de los microorganismos en el cultivo ( $X_0 = 0,2 \text{ g/L}$ )

$Y_{x/s}$ : Rendimiento del sustrato en biomasa

**Tabla 1** Diseño del medio de cultivo mínimo

Nutrientes	Elementos	% elemento en el nutriente	% elemento en biomasa	$Y_{x/s}$	$Y_{x/s} \cdot f$	$S_0$ (g/L)
Sacarosa	C	42	50	0.84	0.084	32.13
Extracto de Quinoa	N	60	14	4.28	-	0.42

*Nota.* En esta tabla se muestran sombreadas las concentraciones a usar en un litro de medio de cultivo.

La variable  $f$  es un factor para crecimiento anaerobio igual a 0,1, solo para la fuente de carbono y energía, la sacarosa es la fuente de carbono y el extracto de quinoa la fuente de nitrógeno.

Al medio de cultivo diseñado se le añadió un buffer fosfato para mantener constante el pH, este debía ser igual a 7. Las concentraciones del buffer a colocar en el medio fueron, 1.5 g/l de fosfato dibásico de potasio ( $K_2HPO_4$ ) y 0.6 g/l de fosfato monobásico de potasio ( $KH_2PO_4$ ).

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

El extracto de quinoa se preparó cocinando 1 cucharada de quinoa (aproximadamente 21.25g) en 30ml de agua, se licuó el contenido obtenido y se tamizó usando una tela. Del líquido resultante, que fue el extracto de quinoa, se usaron 600µl en 1l de medio de cultivo y el resto se refrigeró.

El medio preparado se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Luego y en condiciones de asepsia y cerca de un mechero de alcohol, se colocaron 450ml de medio al matraz del quimiostato y 50ml del inóculo. De esta manera se inició el *cultivo por lotes* con las condiciones mencionadas en el apartado 2.1. A continuación, se midió la densidad óptica a 600nm cada 2 horas y una vez detectada la fase de crecimiento exponencial se inició el *cultivo continuo*. En esta fase se colocó 2l de medio de cultivo en la botella de plástico y se tomaron en cuenta 3 condiciones; flujo de entrada ( $F_E$ ), tasa de dilución ( $D$ ) y tiempo de residencia ( $t$ ). Se trabajó con 3 tasas de dilución diferentes, baja, media y alta, las mismas que se calcularon a partir de la ecuación (3).

$$D = \frac{F_E}{V_{reactor}} \quad (3)$$

Con esto, se determinó que fueron necesarias 13 gotas por minuto correspondientes a un flujo de entrada de 0.6ml/min para una tasa de dilución de  $0.07 \text{ h}^{-1}$ , 73 gotas por minuto, es decir un flujo de 3.33ml/min para una tasa de dilución de  $0.4 \text{ h}^{-1}$  y 100 gotas por minuto, flujo de 5 ml/min, para la dilución más alta de  $0.6 \text{ h}^{-1}$ . Se esperaron 3 tiempos de residencia para alcanzar el estado estacionario, cada uno de estos se obtuvo de la ecuación (4) y se utilizó como dato para el cambio de tasa de dilución después de las pruebas de antibióticos.

$$t = \frac{V_{reactor}}{F_E} \quad (4)$$

El ensayo con antibióticos consistió en colocar una dosificación de 6 antibióticos diferentes por separado en tubos de ensayo con rosca de 7ml de capacidad conteniendo el caldo de bacterias cultivado y medir la densidad óptica a 600nm a las 0 y 24h luego de la puesta en

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

contacto con el medicamento. Los antibióticos fueron dos de la categoría de los aminoglucósidos (amikacina y gentamicina) y cuatro de la categoría de los betalactámicos (biconcilina, ampicilina, amoxicilina y ceftriaxona). La dosis de antibiótico a administrar se determinó a partir de la posología para adultos recomendada en cada medicamento y suponiendo el kg de paciente como kg de agua por día. Las concentraciones de los antibióticos con las que se trabajó se encuentran en el **Anexo 1**.

Esta prueba se realizó luego de alcanzado el estado estacionario en cada dilución y se trabajó por triplicado para cada reactor, se tuvo un blanco por cada antibiótico y dos controles positivos correspondientes a cada biorreactor. El volumen total en cada tubo fue de 6ml, de los cuales el 90% constituía medio más antibiótico-según correspondía- y 10% era el caldo de bacterias. Las cantidades usadas de antibióticos, así como de medio y caldo de bacterias en cada tubo, se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2** *Cantidades de administración en el ensayo de antibióticos*

<b>Tubo</b>	<b>Medio de Cultivo (µl)</b>	<b>Antibiótico (µl)</b>	<b>Caldo de Bacterias (µl)</b>
Amoxicilina (AMX)	5397.75	2.25	600
Blanco AMX	5997.75	2.25	-
Gentamicina (GEN)	5396.79	3.21	600
Blanco GEN	5996.79	3.21	-
Ceftriaxona (CRO)	5394	6	600
Blanco CRO	5994	6	-
Ampicilina (AMP)	5392.5	7.5	600
Blanco AMP	5992.5	7.5	-
Amikacina (AMIK)	5391	9	600
Blanco AMIK	5991	9	-
Biconcilina (BIN)	5385	15	600
Blanco (BIN)	5985	15	-
Controles Positivos	5400	-	600

### **2.2. Detección de comunidades bacterianas resistentes a antibióticos.**

Posterior a la preparación de los tubos, se midió la densidad óptica a 600nm para evaluar el crecimiento celular en cada uno y se incubó por 24h a 37°C. Posterior a este tiempo se volvió a tomar el dato de absorbancia. Estos datos permitieron obtener una razón O.D, a través de la ecuación (5).

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

$$\text{Razón } O.D = \frac{O.D \text{ después de la incubación}}{O.D \text{ antes de la incubación}} \quad (5)$$

Con los valores encontrados de la razón O.D se procedió a obtener un índice de susceptibilidad, mediante la ecuación (6). Se estableció que valores superiores o iguales a uno indicaban una no susceptibilidad de las comunidades bacterianas al antibiótico mientras que valores por debajo de uno se identificaban como comunidades de bacterias susceptibles al antibiótico.

$$\text{Índice} = \frac{\text{Razón } O.D \text{ del tratamiento}}{\text{Razón } O.D \text{ del control positivo}} \quad (6)$$

### 2.3. Análisis Morfológico

Para la identificación morfológica primero se tomó una muestra del caldo bacteriano en el quimiostato en la tasa de dilución igual a  $0.6 \text{ h}^{-1}$  y se realizó el cultivo en dos medios selectivos diferentes; *EMB Agar*, *Levine* para aislamiento de enterobacterias y *Medio EC* para la detección de microorganismos en cuerpos de agua. Este proceso se hizo por duplicado para cada medio, en el cual se sembró  $500 \mu\text{l}$  de caldo bacteriano en cada placa y se incubó por 24h a  $37^\circ\text{C}$ . La morfología de las colonias obtenidas se comparó con la morfología estudiada por Miranda, C., et al., (2012) y el protocolo de placas de *EMB- Agar* de Lal, A. et al., (2007).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

### ETAPA 3. Análisis de la capacidad de la metodología implementada para la detección de comunidades con resistencia a antibióticos

#### 3.1. Evaluación de índice de susceptibilidad en comunidades bacterianas a diferentes tasas de dilución.

Los datos obtenidos de densidad óptica, razón O.D e índice de susceptibilidad (Anexo 2.) se hicieron por duplicado en réplicas independientes y se realizó un análisis en Microsoft Excel de estadística descriptiva comparando sus medias. Las medias obtenidas se graficaron con sus respectivas desviaciones estándar ( $X \pm DE$ ).

# EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

## RESULTADOS

### ETAPA 2. Implementación de la metodología de detección en el laboratorio

#### *Montaje del proceso de detección*

Los dos biorreactores instalados en el laboratorio trabajaron en condiciones anaerobias de tipo facultativo, pues no se implementó ningún mecanismo para la eliminación de oxígeno dentro del matraz. La Figura 5 muestra a los dos biorreactores funcionando en *cultivo continuo* con la tasa de dilución baja ( $D= 0,07h^{-1}$ ). En esta se observa el medio de cultivo de color anaranjado en las botellas de plástico mientras que el matraz conteniendo las bacterias se muestra gris, color característico de las aguas residuales del río Machángara, y en un nivel constante de 500ml.

**Figura 5** Montaje del quimiostato en el laboratorio



*Nota.* En la figura se observa las repisas donde fueron instalados los reactores y que aseguraban un buen flujo del medio al matraz.

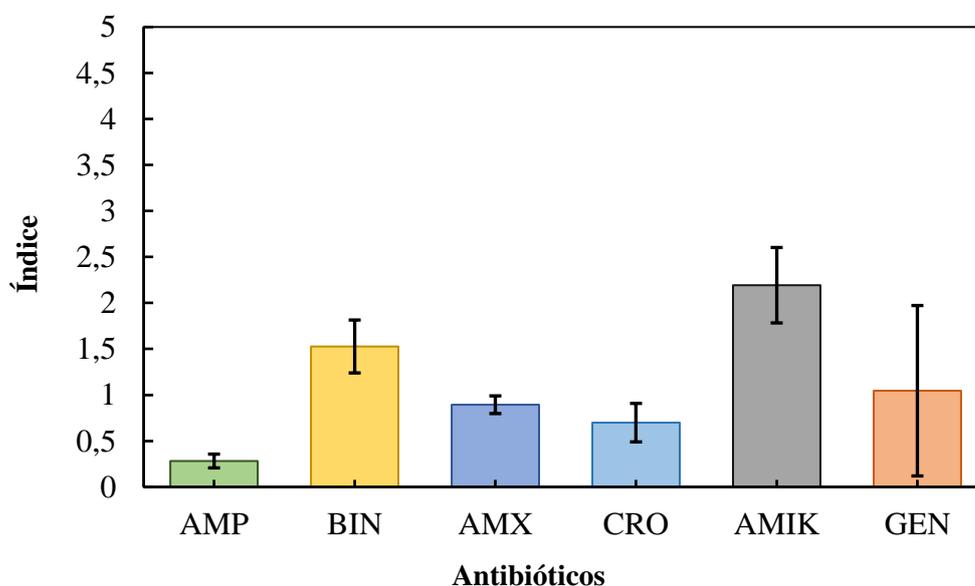
#### *Detección de comunidades bacterianas resistentes*

Después de la puesta en marcha del biorreactor se realizó el ensayo con antibióticos en tres tasas de dilución diferentes y se midió la densidad óptica a 600nm a cada tubo de ensayo

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

estudiado. Con los datos de absorbancia se obtuvo una razón O.D y con este valor se realizaron los cálculos para determinar el índice de susceptibilidad del promedio de ambos reactores. Las gráficas elaboradas son el resultado del análisis estadístico y muestran el índice de susceptibilidad frente a los antibióticos con su respectiva barra de error. En la Figura 6 se encuentra representado el índice obtenido en la tasa de dilución baja igual a  $0.07h^{-1}$ . En esta el índice superior a uno ubico una no susceptibilidad a los antibióticos biconcilina y amikacina con valores de 1.527 y 2.193 respectivamente, es decir, que la comunidad bacteriana cultivada indicó una posible resistencia a estos antibióticos. Si bien Gentamicina posee un índice mayor a uno, (igual a 1.046) no se le incluye en el listado anterior debido a la extensión de la barra de error. Para los betalactámicos restantes, ampicilina, amoxicilina y ceftriaxona se indica una susceptibilidad por parte de las bacterias con velocidad específica de crecimiento baja. El menor valor corresponde a ampicilina con un índice de 0.282. Los valores restantes del índice en esta tasa de dilución se ubican en el Anexo 3.

**Figura 6** Índice de susceptibilidad en la tasa de dilución baja

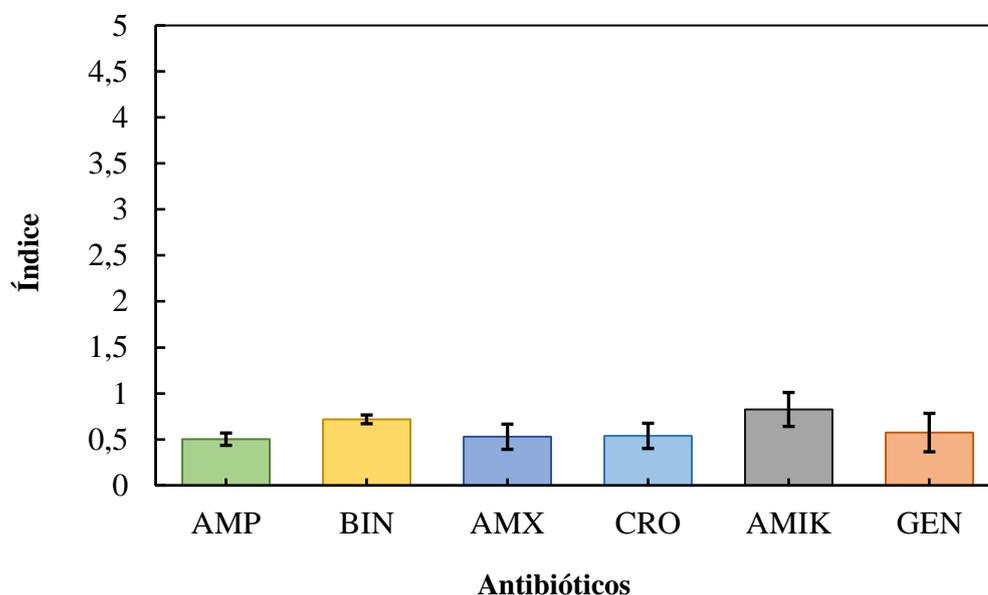


*Nota.* Aparecen de izq. a der. los antibióticos AMP: ampicilina, BIN: biconcilina, AMX: amoxicilina, CRO: ceftriaxona, AMIK: amikacina y GEN: gentamicina.

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

Los valores de índice de susceptibilidad obtenidos en la tasa de dilución media igual a  $0.04h^{-1}$  que se muestra en la Figura 7 evidencia una susceptibilidad a todos los antibióticos, infiriendo que para ninguno de ellos pudo haber una resistencia por parte de la comunidad de bacterias que crecían en el quimiostato. Amikacina en su caso fue el antibiótico con el valor más cercano a uno (0.826), sin embargo, en el presente estudio no se lo considera como un antimicrobiano al que las bacterias cultivadas puedan presentar resistencia. Los valores que se obtuvieron y permitieron construir la gráfica se encuentran en el Anexo 4.

**Figura 7** Índice de susceptibilidad en la tasa de dilución media



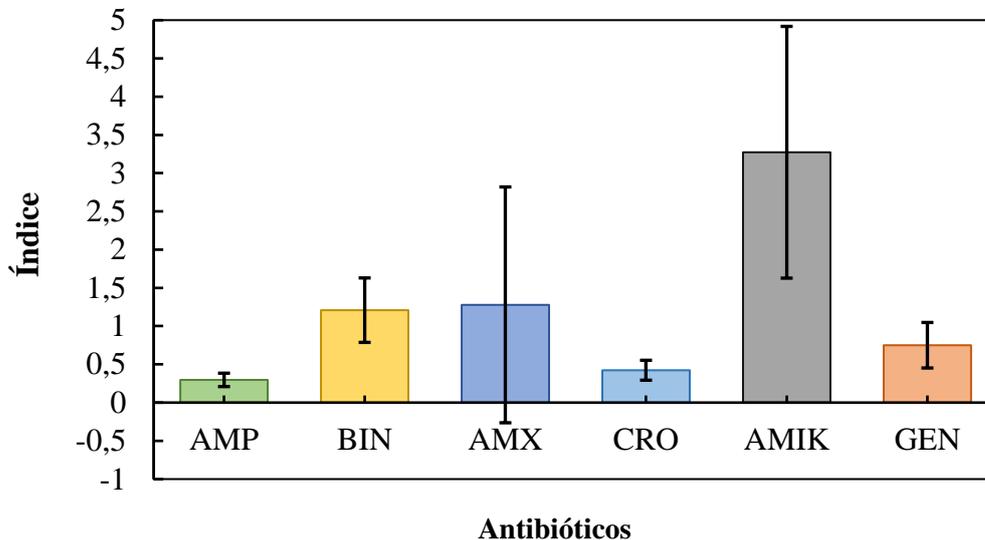
*Nota.* La figura muestra en el eje de las abscisas los antibióticos estudiados donde AMP: ampicilina, BIN: biconcilina, AMX: amoxicilina, CRO: ceftriaxona, AMIK: amikacina y GEN: gentamicina.

En el análisis de la tasa de dilución alta igual a  $0.6h^{-1}$ , las comunidades de bacterias que crecían a altas velocidades específicas de crecimiento mostraron una no susceptibilidad (posible resistencia) a los antibióticos biconcilina con un índice de 1.208 y amikacina con uno de 3.273, tal como se observa en la Figura 8. Además, en esta etapa se consideró a la comunidad de bacterias como susceptibles a los antibióticos gentamicina, ampicilina y ceftriaxona (ver Anexo 4), siendo el índice con el valor más bajo el de ampicilina con 0.297. Amoxicilina presenta un

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

valor grande de desviación estándar llegando a valores cercanos a cero, como tal no se le ubica en ninguno de los dos casos posibles.

**Figura 8** Índice de susceptibilidad en la tasa de dilución alta



*Nota.* Los antibióticos en el eje de las abscisas son AMP: ampicilina, BIN: biconcilina, AMX: amoxicilina, CRO: ceftriaxona, AMIK: amikacina y GEN: gentamicina.

### Análisis Morfológico

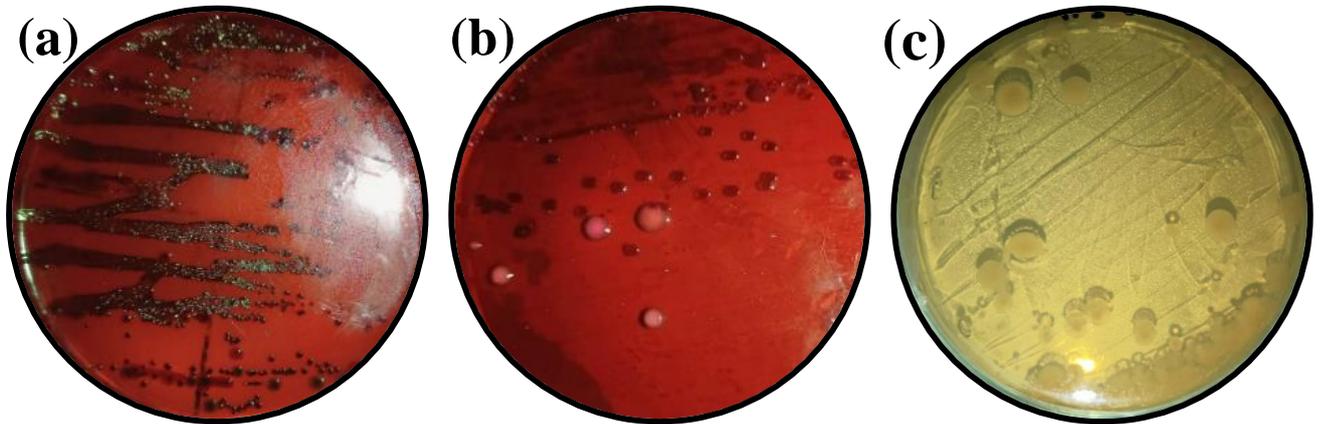
Tras el uso de los medios selectivos *EMB Agar*, *Levine* para aislamiento de enterobacterias y *Medio EC* para la detección de microorganismos en cuerpos de agua, fue posible identificar morfológicamente cuatro microorganismos diferentes. Cabe recalcar que el método de identificación seleccionado no permitiría conocer todas las bacterias que se aislaron con el biorreactor si no solo aquellas que se adaptaron a las condiciones en cada medio de cultivo.

En la Figura 9a se observa colonias pertenecientes a *Escherichia coli*, identificadas así debido a su característico color negro azulado con brillo verde metálico en el medio EMB-agar Levine. Se muestran en la Figura 9b, colonias grandes de color rosa pastel, distintivo de bacterias gran negativas que no fermentan lactosa en el medio EMB, pertenecientes a *Salmonella spp.* y a su vez colonias de *Klebsiella pneumoniae*, las mismas que se muestran redondas, pequeñas,

## EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO

con un centro oscuro y un filo transparente que se pierde con el agar. Por último, se identifica a *Clostridium difficile* en la Figura 9c, por sus colonias redondas, ligeramente translúcidas y de un color amarillo bajo que tiende a ser brillante.

**Figura 9** Cultivo de bacterias en medios selectivos



*Nota.* En esta figura se observa en (a) *Escherichia coli* en EMB Agar, Levine, (b) *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp.* en EMB Agar, Levine y (c) *Clostridium difficile* en Medio EC.

### ETAPA 3. Análisis de la capacidad de la metodología implementada para la detección de comunidades con resistencia a antibióticos

Los datos analizados evidencian que se logró detectar comunidades de bacterias anaerobias con altas velocidades específicas de crecimiento, provenientes de aguas residuales del río Machángara, no susceptibles a biconcilina y amikacina.

# **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

## **DISCUSIÓN**

La resistencia a los antibióticos representa una amenaza no solo para la salud pública, sino también para la salud alimentaria y el desarrollo nacional. Conocer su avance asegura un buen monitoreo y control, por ello los métodos implementados para realizar pruebas de susceptibilidad a los antibióticos deben ser confiables, reproducibles y rentables (Benguigui, Y., et al., 2000).

Los métodos tradicionales de detección de resistencia llevan ventaja en diversas investigaciones con resultados confiables y reproducibles. Tal es el caso del estudio realizado por Bolaños et al., (2015) donde se revela la preocupante situación de los ecosistemas acuáticos contaminados con residuos farmacéuticos y su incidencia en el desarrollo de resistencia a antibióticos. En su evaluación por métodos tradicionales de difusión y dilución determinó que la bacteria aislada, *Escherichia coli*, presentó resistencia múltiple a los antibióticos; amikacina (AMIK), ceftriaxona (CRO) y oxacilina (OXA). La limitación del estudio a una sola cepa hace pensar que otras especies bacterianas no identificadas, en especial aquellas con altas tasas de crecimiento o comunidades bacterianas completas están adquiriendo farmacorresistencia, pero se las omite. De ahí la importancia de contar con nuevas metodologías que lo corroboren y que precisamente fue lo que se esperó en esta investigación con la implementación de un quimiostato, pruebas de contacto con antibióticos y medición de absorbancia.

En su primera etapa, la metodología implementada supuso como modelo de estudio las aguas residuales, pues en ellas se encuentra un variado universo de micro habitantes entre estos, las bacterias anaerobias, microorganismos capaces de vivir sin oxígeno o en concentraciones mínimas de este, causantes de múltiples infecciones de tipo intrabdominal, respiratorias, bucales y otras muy graves en el ser humano (Madigan, M. T., et al., 2003). En las siguientes etapas el uso de un quimiostato acompañado de pruebas de susceptibilidad a antibióticos en tubos de ensayo, ofrecieron la ventaja de poder aislar comunidades bacterianas que crezcan a

## **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

distintas velocidades específicas de crecimiento y su análisis con antibióticos en transferencia directa, siendo de vital importancia aquellas bacterias con altas velocidades específicas de crecimiento, cuyas infecciones serían mucho más rápidas y pondrían en riesgo la respuesta del sistema de salud pública pues se requeriría de un estudio más minucioso del tratamiento con diferentes agentes antimicrobianos (Celis Bustos, Y.A., et al. 2017).

Lupo et al., (2012) explica dos efectos del desarrollo de resistencia en aguas contaminadas por antibióticos; el primero evidentemente es el aumento de resistencia por procesos de selección de las cepas que sobreexpresen mecanismos defensivos como bombas de eflujo o producción de enzimas inactivantes ( $\beta$ -lactamasas) y el segundo involucra el intercambio genético de especies con resistencia intrínseca con otras de resistencia adquirida., donde juega un papel significativo los fagos e integrones para la propagación de estos mecanismos de resistencia. Karkman, A., et al., (2018), menciona también que las aguas residuales por su parte son un reservorio para la transferencia horizontal de genes, lo que permite la propagación de genes de resistencia a los antibióticos entre diferentes especies bacterianas.

Los antibióticos con los que fueron tratadas las comunidades bacterianas son drogas de primera línea y de amplio uso en infecciones comunes de tipo intraabdominales y del tracto respiratorio. De los dos aminoglucósidos estudiados, amikacina obtuvo los valores más altos de índice de susceptibilidad en las tres tasas de dilución analizadas, pero solo en la tasa de dilución baja y alta registró una no susceptibilidad. Díaz Q et al., (2004), reporta por el contrario una mayor actividad antimicrobiana para amikacina y una alta resistencia para gentamicina, en la determinación del nivel CMI y patrones de resistencia correspondientes a enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) detectados por PCR en 100 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de hospitales. De igual forma, en el análisis de Calisto Ulloa, et al., (2018), en aguas residuales descargadas directo al mar antártico se encontró que la bacteria aislada,

## **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

*Escherichia coli*, presentaba alta resistencia a ampicilina (AMP) y resultaba susceptible a amikacina (AMIK), pero destaca que las cepas analizadas solo son una fracción de la población bacteriana que sería diseminada en el ecosistema ártico. Con esto se observa que si bien amikacina puede tratarse como un medicamento de mayor uso frente a gentamicina se corre el riesgo de enfrentarse a otras bacterias diferentes a *Klebsiella* o *Escherichia coli*, donde sí se vea resistencia al antibiótico tal como ocurrió en este estudio.

Los aminoglucósidos en general actúan frente a una infección uniéndose a la fracción 30s de los ribosomas bacterianos, lo que produce es o bien una generación de proteínas truncadas o la inhibición de la síntesis proteica, pero también pueden afectar la permeabilidad de la membrana externa. Son muy útiles frente a gram negativos aerobios y la resistencia a la que se ven afectados se asocia a la producción de enzimas inactivadoras mediadas por plásmidos o transposones (Obando P. P., et al., 2020).

En cuanto a los antibióticos betalactámicos, biconcilina fue el más representativo del grupo en cuanto al valor obtenido de índice de susceptibilidad. Con ello se prevé una posible resistencia a biconcilina en tasas de dilución baja y alta. Un estudio de Rivera-Jacinto et al., (2011) sobre resistencia en enterobacterias a betalactámicos mediante el test confirmatorio de producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) reveló una alta resistencia para ampicilina y menor para ceftriaxona y amoxicilina-clavulanato. En comparación a este trabajo no se pudo comprobar ningún tipo de resistencia a ampicilina.

Por su parte los betalactámicos están diseñados para inhibir la síntesis de peptidoglucano que es el principal precursor en la síntesis de la pared celular bacteriana, con lo cual se activan enzimas autolíticas que desencadenan en la muerte de la bacteria (Castellano G., & Perozo-Mena., 2010). Son muy buenos fármacos atacando en su mayoría bacterias gram positivas y algunas gram negativas anaerobias. Su pérdida de efectividad por resistencia se debe a la producción de  $\beta$ -lactamasas como la penicilinasa plasmídica que rompe el anillo betalactámico.

## **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

Este mecanismo de resistencia se debe a la transferencia de un microorganismo a otro por transducción *in vivo* (Obando P. P., et al., 2020).

Cada uno de los microorganismos identificados en medios selectivos han sido encontrados en aguas residuales y relacionados con algún tipo de resistencia. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp.*, miembros de la familia Enterobacteriaceae se describen en plantas de tratamiento de aguas residuales como resistentes a ampicilina y cloranfenicol de acuerdo a estudios realizados por Machado, E., et al., (2020). *Clostridium difficile* por su parte ha demostrado cierta resistencia a ceftriaxona debido a la producción de enzimas beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Moreno M., et al., 2009).

La rápida diseminación de resistencia a antibióticos hace que se empiece hablar de bacterias multirresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) desarrollándose en cualquier entorno. Considerando los datos obtenidos, esto es un escenario posible en los cuerpos de agua contaminados como lo es el río Machángara, ocasionando un problema en la salud pública relacionado con la propagación de enfermedades infecciosas más graves. Como respuesta afirmativa Marshall (2009) insta a trabajar en un enfoque multidisciplinario que involucre análisis con tecnologías basadas en genes y el estudio de entornos acuícolas y de aguas residuales para comprender mejor la epidemiología y la evolución de la resistencia a los antibióticos.

A lo largo del análisis de detección de resistencia se observó distintos patrones de índice de susceptibilidad para cada tasa de dilución evaluada. Esto debido a que las comunidades bacterianas en cada tasa de dilución también variaban. Rastädter, K., et al., (2021) da evidencia de que cambios en la estructura de los microorganismos se obtienen al someterlos a diferentes tasas de dilución y cambios en el pH, pudiendo de esta manera encontrarse condiciones óptimas de operación.

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

De esto se ratifica que la metodología de detección de resistencia sirvió para encontrar comunidades bacterianas no susceptibles a los antibióticos biconcilina y amikacina. Con ello el escalamiento de este proceso puede llevarse a cabo en laboratorios de microbiología para docencia, pues involucra conocimientos claves en torno al estudio de crecimiento microbiano y pruebas de susceptibilidad, así como también para análisis de la incidencia de los antibióticos en cuerpos de agua y el uso adecuado o inadecuado que se les está dando a estos medicamentos por parte de la población.

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO  
CONCLUSIONES**

- La metodología implementada permitió detectar comunidades bacterianas anaerobias con altas velocidades específicas de crecimiento no susceptibles a dos de los seis antibióticos probados, por tanto, se acepta la hipótesis de investigación.
- Se identificaron cuatro bacterias con posible resistencia a antibióticos creciendo a tasas de dilución altas. Estas fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.* y *Clostridium difficile*. No se descarta la posibilidad de que haya más especies presentes.
- Se identificó distinto perfil de índice de susceptibilidad entre las tres tasas de dilución ensayadas, lo que podría estar relacionado a la presencia de distintas estructuras de comunidades bacterianas en cada tasa de dilución.

**RECOMENDACIONES**

- Se recomienda estudiar la capacidad de la metodología implementada para la detección de resistencia a antibióticos en cuerpos de agua que reciban directamente residuos farmacéuticos, también en desechos agrícolas o en criaderos de animales, pues constituyen fuentes para el desarrollo de resistencia y como tal un problema para la salud pública.
- Complementar la detección de resistencia realizada con una identificación molecular (secuenciación masiva de nueva generación) de las bacterias presentes en las comunidades bacterianas analizadas.
- Se recomienda probar varias dosis del mismo antibiótico o combinaciones entre diferentes grupos, pudiendo obtenerse nuevos datos de susceptibilidad o resistencia.

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO  
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Acevedo, F., Gentina J.M., & Illanes, A. (2002). Fundamentos de ingeniería bioquímica (pp. 91-111). Eds. Universitarias de Valparaíso de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Benguigui, Y., & Salvatierra-Gonzalez, R. (2000). Resistencia antimicrobiana en las Américas: Magnitud del problema y su contención. *Organización Panamericana de la Salud*.
- Bolaños, D., & Mora, L., (2015). *Evaluación de la resistencia a Ceftriaxona, Amikacina y Oxacilina en Escherichia coli presente en vertimientos de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá*. Universidad Santo Tomás-Facultad de Ingeniería Ambiental. <https://n9.cl/87boy>
- Campaña, A., Gualoto, E., & Chiluisa-Utreras, V. (2017). Evaluación físico- química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito. Physic chemical and microbiological assessment of water quality in Machán-gara and Monjas rivers from Quito's metropolitan district. *Bionatura*, 2(2), 305–309. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.02.6>
- Castellano González, M. J., & Perozo-Mena, A. J. (2010). Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 38(1), 18-35.
- Calisto Ulloa, Nancy, Gómez Fuentes, Claudio, & Muñoz, Patricio. (2018). Resistencia a antibióticos en bacterias recolectadas en agua de mar en las proximidades de bases antárticas. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 46(3), 29-39. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-686X2018000300029>
- Celis Bustos, Y. A., Rubio, V. V., & Camacho Navarro, M. M. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 105-117.

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 74(3), 417.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Díaz Q, Patricia, Bello T, Helia, Domínguez Y, Mariana, Trabal F, Natalia, Mella M, Sergio, Zemelman Z, Raúl, & González R, Gerardo. (2004). Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Revista médica de Chile*, 132(10), 1173-1178. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004001000003>
- Espinosa, C. (2019). *El puente sobre el río Machángara es una de las estructuras más antiguas y valiosas de Quito*. *El Comercio*. Recuperado de <https://www.elcomercio.com/actualidad/quito/puente-machangara-estructura-patrimonio-quito.html>
- Gerst J.T. (2000). Detección de la resistencia a los antibióticos con los sistemas VITEK y VITEK 2 de bioMÉRIEUX. *Organización Panamericana de Salud*. 12-23.
- Google Maps. (2013). [Río Machángara de *Google Maps*. Quito, Ecuador]. Recuperado el 22 de julio de 2022 de <https://acortar.link/4Dm5gY>
- Grupo Colaborativo Resist Net. (2000). La Resistencia a los Antibióticos en América Latina: Importancia de los Programas Artemis y Resist Net. *Organización Panamericana de la Salud*. 39-53.
- Harmand, J., Lobry, C., Rapaport, A., & Sari, T. (2021). El quimiostato: Teoría matemática del cultivo continuo de microorganismos. ISTE Group.
- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., & Virta, M. P. (2018). Antibiotic-resistance genes in wastewater. *Trends in microbiology*, 26(3), 220-228.
- Lal, A., & Cheeptham, N. (2007). Eosin-methylene blue agar plates protocol. *American Society for Microbiology*.

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

- Lozano, C. M. (2021). ¿CUÁNTOS SON DEMASIADOS ANTIBIÓTICOS? REFLEXIONES ACERCA DEL USO Y CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS \* HOW MANY ARE TOO MANY ANTIBIOTICS? REFLECTIONS ON THE USE AND CONSUMPTION OF ANTIBIOTICS. *Revista de Antropología*, 76(1). <https://doi.org/10.3989/dra.2021.007>
- Lupo, A., Coyne, S., & Berendonk, T. U. (2012). Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in microbiology*, 3, 18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00018>
- Machado, E. C., Leal, C. D., Coelho, B. L., Chernicharo, C. A. D. L., & Araújo, J. C. D. (2020). Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 25, 847-857.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock. *Biología de los microorganismos* 12 ed. Editorial Pearson Prentice Hall Iberia, Madrid. Pp, 1064.
- Marshall, B. M., Ochieng, D. J., & Levy, S. B. (2009). Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe*, 4(5), 231-238.
- Martínez C, L., & Porras G, A. (2021). *Guía-ABE - lectura-interpretada-del-antibiograma*. Guia-Abe.es. <http://www.guia-abe.es>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2019). *Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana*; Quito, Viceministerio de Gobernanza y Vigilancia de la Salud. Disponible en <http://salud.gob.ec>
- Miranda, C., & Rojo, M. D. (2012). *Clostridium perfringens*: infecciones de piel y tejidos blandos. Febrero, 17, 2020.
- Moreno M, Claudia, González E, Rubén, & Beltrán, Constanza. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y*

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

cirugía de cabeza y cuello, 69(2), 185-192. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>

Naturales, C., Moreno-Samaniego, M. I., & Ochoa-Pilco III Joselyn, J. (2021). Caracterización microbiológica de muestras de aguas servidas pre filtradas de la comunidad de San Vicente de lacas de la provincia de Chimborazo (Microbiological characterization of pre-filtered served water samples from San Vicente de lacas community in. 6(9), 112–130. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i9.3013>

Obando Pacheco P, Suárez-Arrabal MC, Esparza Olcina MJ. (2020). Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos. Guía\_ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico [en línea]. Disponible en: <https://www.guia-abe.es>

OPS. (2018). *Trabajando juntos para combatir la resistencia a los antimicrobianos - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. Paho.org. <https://n9.cl/zzeo7>

OMS. (2020). *Resistencia a los antibióticos*. Who.int; World Health Organization: WHO. <https://n9.cl/fjd9c>

Rastädter, K., Wurm, D. J., Spadiut, O., & Quehenberger, J. (2021). Physiological Characterization of *Sulfolobus acidocaldarius* in a Controlled Bioreactor Environment. *International journal of environmental research and public health*, 18(11), 5532.

Rivera-Jacinto, Marco, Rodríguez-Ulloa, Claudia, Huayán-Dávila, Gladys, & Mercado-Martínez, Pedro. (2011). Susceptibilidad a betalactámicos y resistencia por betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en Enterobacteriaceae aisladas de reservorios ambientales de un hospital general en Cajamarca, Perú.\*. *Revista Médica Herediana*, 22(2), 69-75. Recuperado en 18 de septiembre de 2022, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2011000200005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2011000200005&lng=es&tlng=es).

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

Romeua, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., Eslava, C., & A.

(2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas.

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 41, 1–9.

Tenover F.C, & Mohammed J.M. (2000). Elección de un método para la vigilancia de bacterias resistentes a los antimicrobianos. *Organización Panamericana de la Salud*.3-7.

Vesper, I. (2019). *Resistencia antimicrobiana: hechos y cifras*. América Latina Y El Caribe.

<https://www.scidev.net/america-latina/feature/resistencia-antimicrobiana-hechos-y-cifras/>

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO  
ANEXOS**

**Anexo 1.**

**Tabla 3** *Concentraciones de antibióticos*

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración(mg/ml)</b>
Amoxicilina (AMX)	3.33
Gentamicina (GEN)	5.61
Ceftriaxona (CRO)	20
Ampicilina (AMP)	64.10
Amikacina (AMIK)	10
Biconcilina (BIN)	67.84

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**Anexo 2.**

**Tabla 4** Razón O.D e Índice de susceptibilidad en las diferentes tasas de dilución

Antibiótico	D = 0.07 h-1			D = 0.4 h-1			D = 0.6 h-1		
	Razón O.D C+	Razón O.D antibiótico	Índice	Razón O.D C+	Razón O.D antibiótico	Índice	Razón O.D C+	Razón O.D antibiótico	Índice
<b>AMP</b>		0,379	0,282		0,933	0.503		0,594	0,297
<b>BIN</b>		2,056	1,527		1,333	0.718		2,417	1,208
<b>AMX</b>		1,203	0,894		0,983	0.529		2,556	1,278
<b>CRO</b>	1,346	0,940	0,699	1,857	1,000	0.538	2,000	0,846	0,423
<b>AMIK</b>		2,952	2,193		1,533	0.826		6,545	3,273
<b>GEN</b>		1,407	1,046		1,067	0.574		1,500	0,750

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**Anexo 3.**

**Tabla 5** Valores de índice y desviación estándar (D.E) a una tasa de dilución de  $0.07h^{-1}$

<b>Antibiótico</b>	<b>Índice <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Interpretación</b>
Ampicilina (AMP)	$0.282 \pm 0.075$	
Biconcilina (BIN)	$1.527 \pm 0.288$	*
Amoxicilina (AMX)	$0.894 \pm 0.096$	
Ceftriaxona (CRO)	$0.699 \pm 0.209$	
Amikacina (AMIK)	$2.193 \pm 0.410$	*
Gentamicina (GEN)	$1.046 \pm 0.926$	

*Nota:* En la tabla se observa que para la columna de interpretación los recuadros vacíos corresponden a aquellos antibióticos a los que fueron susceptibles y (\*) a aquellos a los que fueron resistentes las comunidades de bacterias evaluadas.

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON  
ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**Anexo 4.**

**Tabla 6** Valores de índice y desviación estándar (D.E) a una tasa de dilución de  $0.4h^{-1}$

<b>Antibiótico</b>	<b>Índice <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Interpretación</b>
Ampicilina (AMP)	$0.503 \pm 0.067$	
Biconcilina (BIN)	$0.718 \pm 0.048$	
Amoxicilina (AMX)	$0.529 \pm 0.137$	
Ceftriaxona (CRO)	$0.538 \pm 0.137$	
Amikacina (AMIK)	$0.826 \pm 0.184$	
Gentamicina (GEN)	$0.574 \pm 0.209$	

*Nota:* En esta tabla se observa que no hubo resistencia para ninguno de los antibióticos estudiados, por ende, en ninguna fila se encuentra el símbolo (\*) alusivo a la no susceptibilidad.

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES BACTERIANAS CON ALTAS TASAS DE CRECIMIENTO**

**Anexo 5.**

**Tabla 7** Valores de índice y desviación estándar (D.E) a una tasa de dilución de  $0.6h^{-1}$

<b>Antibiótico</b>	<b>Índice <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Interpretación</b>
Ampicilina (AMP)	$0.297 \pm 0.088$	
Biconcilina (BIN)	$1.208 \pm 0.421$	*
Amoxicilina (AMX)	$1.278 \pm 1.542$	
Ceftriaxona (CRO)	$0.423 \pm 0.130$	
Amikacina (AMIK)	$3.273 \pm 1.646$	*
Gentamicina (GEN)	$0.750 \pm 0.298$	

*Nota:* En esta tabla se muestran con el símbolo (\*) aquellos antibióticos a los que posiblemente presentan resistencia las comunidades de bacterias aisladas y recuadros vacíos son susceptibles.