
UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

Evaluación de una tecnología para la detección de comunidades bacterianas aerobias con multiresistencia a antibióticos a diferentes velocidades específicas de crecimiento.

Realizado por:
DORIS ALEJANDRA LAHUATTE IMBAQUINGO

Director del proyecto:
Dr. Alberto Aguirre., PhD.

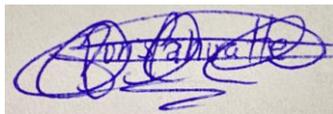
Como requisito para la obtención del título de:
MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, agosto de 2022

ANEXO B

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, Doris Lahuatte, con cédula de identidad 0923566558 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.



FIRMA Y CÉDULA
0923566558

ANEXO C

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

Evaluación de una tecnología para la detección de comunidades bacterianas aerobias con multiresistencia a antibióticos a diferentes velocidades específicas de crecimiento.

Realizado por:
Doris Alejandra Lahuate Imbaquingo

como Requisito para la Obtención del Título de:
MAGISTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor
ALBERTO AGUIRRE

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

ANEXO D

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

LINO ARISQUETA HERRANZ.

JUAN CARLOS NAVARRO C.

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, agosto de 2022

ANEXO E

DEDICATORIA

A mis padres, Gina y Hernán

Mi hermano, Braulio

Mis amigos, Santiago, Karol, Paula , Belén

AGRADECIMIENTO

A mi familia, por todo su apoyo.

A mis profesores del programa de Maestría, por compartir sus conocimientos.

ANEXO F

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

SALUD GLOBAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Artículo de tesis

Evaluación de una tecnología para la detección de comunidades bacterianas aerobias con multiresistencia a antibióticos a diferentes velocidades específicas de crecimiento.

Doris Lahuatte¹, Alberto Aguirre^{1,2*}

¹Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud; dlahuatte.mbme@uisek.edu.ec; alberto.aguirre@uisek.edu.ec

²Universidad Internacional SEK, Biomedicina aplicada y experimental, Facultad de Ciencias de la Salud; alberto.aguirre@uisek.edu.ec

*Autor de Correspondencia: alberto.aguirre@uisek.edu.ec

Resumen: La resistencia a antibióticos es una problemática mundial, el incremento en la prevalencia de estos microorganismos tiene gran impacto a nivel económico y especialmente en la salud pública. Estas bacterias resistentes pueden acarrear problemas en el tratamiento de enfermedades causadas por las mismas. Asimismo, a nivel industrial, el mal uso de antibióticos en la industria alimentaria ha provocado el esparcimiento de estos microorganismos e incluso su transferencia a otros seres vivos. Los métodos convencionales para la identificación de bacterias resistentes y pruebas de susceptibilidad de estos organismos contra diferentes antibióticos no permiten detectar bacterias con altas tasas específicas de crecimiento y tampoco determinar la resistencia de una comunidad microbiana a diferentes antibióticos. Es por eso que se evaluó un nuevo sistema tecnológico (biorreactor quimiostato de fase simple seguido de un sistema de susceptibilidad a antibióticos) para detectar comunidades bacterianas multiresistentes a antibióticos; este sistema nos permitirá ejercer una presión selectiva para bacterias con altas tasas de crecimiento y además evaluar la susceptibilidad a un antibiótico en una comunidad bacteriana.

Se utilizaron alimentos recolectados en mercados del Distrito Metropolitano de Quito, los cuales fueron inoculados en el quimiostato simple de una etapa para aislar comunidades bacterianas a 3 diferentes tasas de crecimiento. Posteriormente, las muestras aisladas del biorreactor pasaron a una prueba de susceptibilidad a 5 diferentes antibióticos para observar cambio en las densidades ópticas antes y después del tratamiento; seguido, se realizó la secuenciación de tercera generación de las muestras que mostraron poca susceptibilidad a los diferentes antibióticos para identificar los diferentes géneros en cada comunidad bacteriana y analizar sus antecedentes de resistencia a los diferentes antibióticos.

Se encontró que el nuevo sistema tecnológico tiene la capacidad de aislar comunidades bacterianas a altas tasas específicas de crecimiento, seguido del sistema de susceptibilidad en el cual las comunidades bacterianas no mostraron una alta susceptibilidad a la gentamicina y ceftriaxona. Además, mediante la identificación mediante secuenciación, se encontró que el género bacteriano predominante en estas muestras fue *Stenotrophomas*, cuyos miembros han sido relacionados con agentes patógenos y resistencia a antibióticos, por lo que es importante llevar un monitoreo de este tipo de bacterias en alimentos de consumo diario.

Palabras clave: resistencia ; antibióticos; bacterias; secuenciación; MiniOn; susceptibilidad; quimiostato

Abstract: Antibiotic resistance is a global problem, the rise in the prevalence of resistant microorganisms has a great impact on the industry, especially in the public health area. These multi-resistant bacteria could cause adverse effects in the treatment of disease caused by the resistant bacteria itself. Moreover, in the industry, the overuse of antibiotics in the food industry has caused the spread of these microorganisms and even the transfer of these bacteria from one organism to another. The conventional methods used for the identification of resistant bacteria and their susceptibility to different antibiotics do not allow the detection of bacteria with specific high growth rates. In addition, these methods do not allow to determine susceptibility to an antibiotic in a population of bacteria, they are based on pure cultures.

In this study, we have evaluated a new methodology (a single-stage chemostat, followed by an antibiotic susceptibility test) to detect bacterial communities multiresistant to antibiotics. This system will allow us to put selective pressure on bacteria with high growth rates and to evaluate the susceptibility to a specific antibiotic in a bacterial community.

Food was collected from a popular market in Quito and then inoculated in the bioreactor to isolate microorganisms at three different dilution rates. Afterward, the samples isolated from the bioreactor were tested by a susceptibility test with 5 different antibiotics. This study was based on the fold change of the optical density before and after the treatment. Finally, a massive sequencing of the samples that showed non-susceptibility to the antibiotics used before was performed, which allowed us to identify and analyze the history of multi-resistance of a genus.

As a result, the new technological system has the capacity to isolate bacterial communities that grow at high rates. Moreover, the susceptibility test showed that bacteria do not show susceptibility to gentamicin and ceftriaxone. In addition, the identification of the genus by the sequencing showed that the most abundant genus was *Stenotrophomas*, whose members have been related to some pathogenic strains that are resistant to antibiotics, which is why it is important to have control and monitoring of this type of bacteria in daily consumed food.

Keywords: Resistance, antibiotics, bacteria, nanopore-sequencing; MiniOn; susceptibility; chemostat.

1. Introducción

El rápido incremento de bacterias resistentes se ha convertido en una problemática a nivel mundial, debido a que pelagra la efectividad de los antibióticos para el control de infecciones causadas por las mismas. El uso de antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, quien fue el primero en advertir que el mal uso y sobre uso de antibióticos podría causar bacterias resistente (Lowe, 1982). Las bacterias, como cualquier ser vivo, buscan el modo de sobrevivir en su ambiente, por esto han creado mecanismos para evitar ser eliminados por moléculas antibacterianas (Felden & Cattoira, 2018). Entre los principales mecanismos de resistencia tenemos: la resistencia intrínseca de la bacteria, como por ejemplo acciones que toma la célula para evadir el efecto de la droga como las bombas de expulsión; segundo, el mecanismo adquirido, ya sea por transferencia horizontal o mutaciones de genes que crean resistencia ante el antibiótico y por último, la resistencia adaptativa que es el adquirir progresivamente la resistencia a un antibiótico por la activación de un gen, esta activación puede darse por el mal uso del mismo antibiótico (Hughes & Andersson, 2017). Las principales causas por las cuales las bacterias adquieren estos mecanismos son: el mal uso, inapropiada prescripción, y el sobreuso de antibióticos el área de salud y agricultura. Actualmente, mediante análisis moleculares se detectó incluso una multiresistencia adquirida por las bacterias, mediante la captura y acumulación de genes resistentes a antibióticos que tienen la capacidad de moverse en la bacteria y entre diferente cepas de bacterias. Las infecciones causadas por estos organismos multiresistentes ha incrementado la mortalidad, morbilidad y los costos en la salud a nivel global (Partridge et al., 2018).

El uso abundante de antibióticos en la industria de alimentos conlleva la acumulación de residuos de antibióticos, especialmente en alimentos de consumo diario como carnes, leche y huevos. La acumulación de residuos de antibióticos en los alimentos puede tener efectos negativos en el ser humano causando enfermedades por microorganismos que presenten una resistencia a los antibióticos (Chen et al., 2019). Se ha demostrado que la transferencia de estas bacterias multiresistentes a los humanos puede darse por la ingesta de alimentos que han sido tratados con antibióticos, y el consumo de carne de animales que han sido alimentados y tratados con los mismos antibióticos (Ventola, 2015). La resistencia a antibióticos en las bacterias, limita y dificulta el tratamiento de infecciones causadas por estos organismos (Lehtinen et al., 2019). Seo et al. (2020) mencionan que la *Salmonella spp.* es una bacteria aerobia y es uno de los patógenos más asociados con la ingesta de comida, causando infecciones intestinales. Además, las infecciones causadas por *Salmonella spp.* se han convertido en un problema de salud pública en los países en desarrollo (Hall & Carroll, 2016). Por lo tanto, el incremento de consumo de alimentos tratados con antibióticos a nivel mundial hace que sea importante su control efectivo.

En Ecuador, el Ministerio de Salud Pública (2018) reporta el primer caso de resistencia antimicrobiana a los antibióticos en el año 2010, desde ese momento los casos de bacterias con resistencia han aumentado significativamente lo que ha provocado el aumento en la estadía hospitalaria y la disminución del éxito de tratamientos. Por otra parte, la problemática presentada en el Ecuador son las enfermedades causadas por bacterias resistentes a antibióticos en larvas de camarón, estas infecciones pueden causar incluso una mortalidad del 100% en las larvas infectadas, afectando la economía del país (Gómez, 2016).

Con el incremento de bacterias con multiresistencia a antibióticos, la necesidad de tener técnicas para determinar su susceptibilidad a antimicrobianos también ha incrementado. Este tipo de pruebas se necesitan no solo para mejorar el tratamiento de personas infectadas con estos organismos, sino también para controlar la propagación de estos microorganismos o genes resistentes en las comunidades (Fluit et al., 2001). Entre las técnicas convencionales para medir la susceptibilidad de bacterias a antibióticos tenemos el método de difusión en agar o antibiograma, que consiste en inocular una concentración estándar de bacteria en una placa de agar, discos de papel impregnados con antibióticos son añadidos en la placa y el radio de inhibición cerca del disco es medido (Jorgensen & Ferraro, 2009). Una de las desventajas de este método es que solo es cualitativo y, sobre todo, este método debe ser modificado para trabajar con bacterias de tasa de crecimiento lento (Herrera, 1999), con este método estaríamos limitando el grupo de bacterias que pueden ser aisladas. Entre los métodos cuantitativos tenemos los que miden la concentración inhibitoria mínima, estas pueden ser dilución en agar, micro titulación en tubo y E-E test. Las ventajas de estos métodos es que permiten conocer con exactitud que concentración de antibiótico es necesaria para controlar el proceso infeccioso. Sin embargo, como desventajas tenemos las altas exigencias técnicas y el período de tiempo prolongado requerido para la interpretación de resultados (Herrera, 1999). En general, este tipo de pruebas tiene como tiempo de espera por un resultado aproximadamente 72 horas, lo que obliga en el caso clínico a recurrir a un tratamiento sin resultados o a retrasar tratamientos que podrían necesitar ser atendidos más pronto para evitar el avance de la infección y futuras complicaciones (Kelley, 2017). Por último, tenemos los métodos genéticos y moleculares como PCR, DNA microarray, chip ADN, etc., los cuales se muestran prometedores, ya que podrían mostrar el gen causante de la resistencia (Fluit et al., 2001). Sin embargo, estos métodos no son comúnmente requeridos en el área clínica e industrial. Finalmente, las técnicas convencionales se basan en cultivos puros, mas no en una comunidad bacteriana. Además, estas técnicas convencionales no permiten detectar comunidades bacterianas que presenten altas velocidades específicas de crecimiento; ninguna técnica genera una presión selectiva sobre una comunidad que tenga altas tasas de crecimiento.

En vista que las pruebas para detectar bacterias resistentes en enfermedades infecciosas no permiten el aislamiento e identificación de bacterias con una tasa de crecimiento alta y nos limitan a una comunidad bacteriana axénica, en este proyecto evaluamos si un medio de cultivo continuo con la ayuda de un quimioestado, seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos nos permite aislar e

identificar bacterias aerobias multiresistentes. El quimiostato es un sistema de cultivo continuo que permite mantener en crecimiento constante a una población celular, así como también bajo condiciones fisiológicas constantes, este mantiene una población estable de las bacterias (Acevedo et al., 2002; Allen & Waclaw, 2019). Este sistema permite un cultivo continuo, donde la velocidad específica de crecimiento puede ser elegida y el estado fisiológico de la población es constante y seleccionable (Acevedo et al., 2002). Cabe recalcar que la resistencia a antibióticos es influenciada por la tasa de crecimiento de las bacterias (Hughes & Andersson, 2017). El quimiostato ha sido usado como herramienta para verificar si una bacteria es resistente a un antibiótico en específico y así optimizar una terapia para la enfermedad infecciosa causada por esa bacteria. Por ejemplo, el uso de ceftazidime and meropenem para optimizar la terapia contra *Pseudomonas aeruginosa*, la cual presenta una rápida resistencia a estos antibióticos (Feng et al., 2017). Por otro lado, el quimiostato ha sido usado para comprobar si una bacteria puede adquirir resistencia a un antibiótico en específico después de un tiempo determinado. Feng et al. (2016) mencionan que el uso del quimiostato ayudó a simular el ambiente de un paciente infectado y así comprobar si la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* adquiere una resistencia *de Novo* o por intercambio genético. Sin embargo, el uso del quimiostato para identificar bacterias con multiresistencia antibióticos no ha sido aplicado. Es por eso que en este proyecto se busca evaluar el nuevo sistema tecnológico (quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos) para detectar bacterias aerobias multiresistentes a antibióticos y que presenten altas velocidades específicas de crecimiento.

Objetivo general: Evaluar la eficacia de un nuevo sistema tecnológico, quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos para la detección de comunidades bacterianas aerobias no susceptibles a antibióticos y que presentan altas velocidades específicas de crecimiento en matrices alimenticias y como objetivos específicos: implementar el nuevo sistema quimiostato simple de una etapa y examinar la eficacia del sistema tecnológico utilizado para la detección de comunidades bacterias aerobias no susceptibles a antibióticos en tres diferentes tasas de dilución (0.042, 0.4 y 0.6 h⁻¹) e identificar por secuenciación masiva de nueva generación los géneros de bacterias aerobias multiresistentes a antibióticos con mayor abundancia en las muestras cultivadas en el biorreactor

2. Materiales y Métodos

2.1. Detección de comunidades bacterianas aerobias susceptibles a antibióticos

2.1.1 Recolección de muestras de matrices alimentarias.

Matrices alimenticias de carnes (pollo, cerdo, res), comidas preparadas (cevichocho, salchipapa y hornado) y lácteos (queso, leche) fueron tomadas de un mercado al centro-sur del Distrito Metropolitano de Quito, donde se observó una constante afluencia de personas. Las muestras fueron trituradas y pasadas por un colador para obtener su extracto, el cual se conservó a -4°C para su futuro uso en los biorreactores.

2.1.2 Diseño de medio de cultivo.

Tomando en cuenta la necesidad de oxígeno para el crecimiento bacteriano, se diseñó un medio de cultivo para bacterias aerobias con la fórmula $S_o = S_f + [(X_f - X_o) / Y_{x/s}]$ (Acevedo et al., 2002). Donde, S_o es la concentración inicial requerida de los diferentes nutrientes para el crecimiento de los microorganismos en el biorreactor. Se utilizó como nutrientes para el medio de cultivo sacarosa, que está compuesta de carbono (20- 40 %) y extracto de quinoa que contiene nitrógeno. En el caso de bacterias aerobias, el S_o de la sacarosa se multiplicó por el factor 0.55, donde se corrige la cantidad de carbono que la bacteria usa para su crecimiento. Además, la sacarosa se multiplicó por el factor 1.5 para evitar que se convierta en el nutriente limitante. Finalmente, cada valor de S_o se calculó para un litro de medio, en donde las concentraciones finales de cada componente fueron, sacarosa (5.82 g/L), Quinoa 600 uL (0.42 g/l) y adicional, buffer fosfato K_2HPO_4 (1.5 g/l) y KH_2PO_4 (0.6 g/l).

2.1.3 Montaje del quimiostato simple de una etapa

Dos réplicas de biorreactores se ensamblaron con matraces de 500 mL, los cuales fueron diseñados con una entrada y salida de flujo de medio. Los matraces fueron conectados a botellones de medio fresco con mangueras de silicona y una válvula para controlar la entrada de flujo (Figura 1, Anexo 1). Adicionalmente, la salida de desechos fue establecida a los 500 ml para mantener un volumen constante de medio dentro del biorreactor. Además, en los dos biorreactores aerobios, una bomba de pecera con flujo constante introdujo oxígeno (8L/Min) en el medio permanentemente (Figura 1). Por último, el matraz principal se colocó en una plancha de calentamiento a 30 °C para mantener una temperatura constante y se preparó una solución saturada de sulfato de cobre conectada a la salida de gases del reactor.

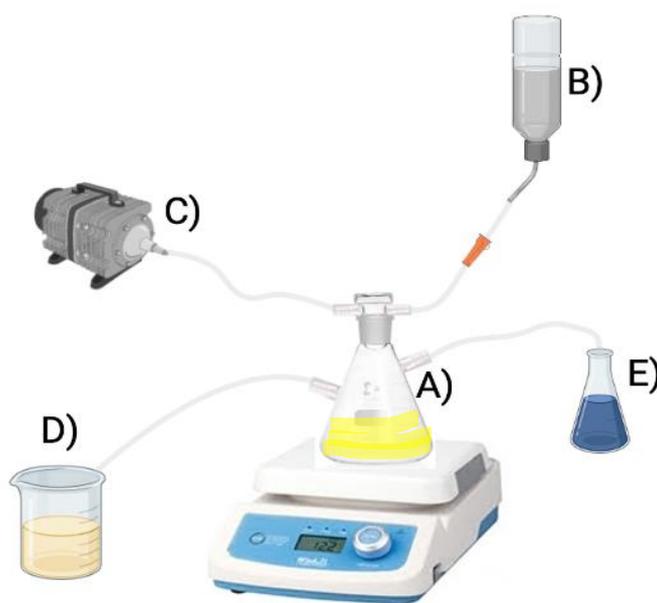


Figura 1. Esquema del sistema biorreactor simple de una etapa. A) Matraz principal con el inóculo. B) Medio fresco con válvula de suero para regular el flujo de entrada de medio al reactor. C) Bomba de aire. D) Recolector de desechos líquidos. E) Solución de sulfato de cobre para desecho de gases.

2.1.4 Operación del sistema tecnológico

Primero hubo una fase de aclimatación, donde 2 ml del extracto puro de los alimentos preparado anteriormente se colocó en un matraz con 20 ml de medio de cultivo y se tapó con gasa y algodón. Este periodo duró 72 horas a una temperatura de 30 °C con agitación para permitir la entrada de oxígeno al medio.

Para la puesta en marcha del quimiostato se empezó con un cultivo por lotes. Primero se inoculó cada biorreactor con 50 ml del inóculo de la fase de aclimatación en 450 ml de medio de cultivo fresco. Una vez comprobado que los microorganismos se encontraban en fase de crecimiento exponencial se comenzó la alimentación continua al reactor.

Para calcular las tasas de dilución (D) se tomó en cuenta la fórmula $D=F/V$, donde F es la velocidad del flujo de medio (ml/hr) y V es el volumen de líquido dentro del reactor (ml).

En el transcurso del experimento los biorreactores se operaron a tres diferentes tasas de dilución (0.042, 0.4, 0.6 h⁻¹) comenzando a operarse a la menor tasa de dilución. En cada tasa se mantuvo los mismos parámetros fisiológicos como pH 7, temperatura de 30°C y el flujo de aire permanente dentro del cultivo. Una vez establecida la tasa de dilución, se esperó al menos 3 tiempos de residencia para comprobar que el cultivo se encontraba en estado estacionario. Cada tiempo de residencia (T) se calculó con la fórmula $T = V/F_{Entrada}$, donde V es el volumen de medio en el quimiostato (L) y F es el flujo de entrada (l/h⁻¹).

Una vez se llegó a estado estacionario se ingresaron alícuotas (0.6 ml) del caldo de cultivo del quimiostato a tubos de ensayo para la prueba de susceptibilidad a antibióticos.

2.1.5 Prueba de susceptibilidad a antibióticos

Se escogieron 5 antibióticos (amoxicilina, gentamicina, amikacina, ceftriaxona y ampicilina), los cuales son parte de las clases de antibióticos de uso común en Ecuador para el tratamiento de enfermedades de tipo bacterianas (Ministerio de Salud Pública, 2018).

Para la prueba de susceptibilidad se calculó una dosis de 24 h de cada antibiótico para 600 ul inóculo en los tubos de ensayo. La dosis se basó en la posología sugerida por cada fabricante en su empaque. Después, se aforó la dosis de cada antibiótico, el inóculo y medio de cultivo para tener un total de 6 ml de líquido de cultivo en cada tubo de ensayo, las cantidades específicas de antibiótico, medio de cultivo e inóculo usadas en cada tubo se indican en la **Tabla 1**. Una vez los cultivos fueron tratados con el antibiótico se midió la absorbancia a $\lambda = 600$ nm (hora 0) y se incubaron a 37°C; se midió densidad óptica (DO) cada 24 horas hasta las 72 horas, para medir el cambio de masa bacteriana durante el tiempo.

Tabla 1.

Dosis de antibióticos y volumen de medio de cultivo e inóculo utilizados en las pruebas de susceptibilidad.

Antibiótico	Clasificación	Dosis (ug/ml)	Medio de cultivo (uL)	Inóculo (uL)	V total (uL)
Amoxicilina	Betalactámico	3125	5398	600	6000
Gentamicina	Aminoglucósido	500	5397	600	6000
Amikacina	Aminoglucósido	2500	5391	600	6000
Ceftriaxona	Cefalosporina	3333	5394	600	6000
Ampicilina	Betalactámico	666666	5393	600	6000
Control	-	-	5400	600	6000

*En el tubo control no se incluyó ningún antibiótico, cada antibiótico obtuvo su dosis basado en la posología recomendada por el fabricante.

Fuente: La autora (2022)

En este caso, para saber si hubo un cambio en el crecimiento bacteriano, se calculó la razón DO (Densidad óptica) de cada muestra dividiendo la DO después de la incubación para la DO inicial (hora 0). Para poder normalizar los datos y poder hacer una comparación entre los datos se dividió la razón DO de cada antibiótico para la razón DO de su respectivo control. A continuación se realizó una tabla de interpretación de la susceptibilidad a cada antibiótico (**Anexo 2**) donde la razón DO normalizada ≥ 1 indica que no hubo susceptibilidad al antibiótico mientras una razón DO normalizada < 1 indica que hubo susceptibilidad al antibiótico.

Finalmente, las bacterias presentes en los tubos usados en el análisis de susceptibilidad fueron conservadas mediante congelación a -20°C utilizando glicerol (200 ul de glicerol + 800 ul de caldo de cultivo) para ser usadas posteriormente en análisis moleculares enfocados en la identificación de las bacterias que compusieron las comunidades bacterianas dentro de los tubos.

2.2 Identificación de bacterias aerobias aisladas

2.2.1. Extracción y cuantificación de ADN genómico.

Para la extracción de ADN se tomaron 200 uL de las muestras conservadas. Se realizó una extracción de ADN genómico de bacterias por columnas con el kit D511 (Applied Biological Materials Inc) donde se siguió el protocolo del fabricante. Posteriormente, se cuantificaron las muestras extraídas mediante un método fluorimétrico con el fluorómetro Qbit2.0 (Invitrogen). 1uL de cada muestra fue examinado con el kit Qubit 1X dsDNA HS, de igual manera siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen). Aquí, basados en la razón DO normalizada de la última tasa de dilución (0.6) y en la cantidad y calidad de ADN extraído se escogieron las muestras de gentamicina y ceftriaxona para proceder con la secuenciación.

2.2.2 Amplificación PCR del gen16S rRNA

Se utilizaron primers para amplificar dos regiones, V3-V4 y V4-V5, del gen 16 s rRNA (**Tabla 2**), por este motivo para cada muestra se llevó a cabo 2 PCR's. Para la preparación del mastermix, se tomó en cuenta el protocolo usado anteriormente por Mei et al, (2022) y Wang et al, (2020) , con modificaciones en la cantidad de polimerasa y buffer. Las concentraciones finales por cada reacción fueron las siguientes: 5 μl de 5X MegaFi™ Buffer (Applied Biological Materials), 0,5 μl dNTPs (10mM), 1 μl de cada primer forward y reverse (0,4mM) y 0,5 μl de MegaFi™ Fidelity ADN Polimerasa (Applied Biological Materials) para tener un volumen total de 25 μl por reacción.

Tabla 2.

Primers de las regiones V3-V4, V4-V5.

Región	Tamaño del Fragmento	Primer	Secuencia primer (5'- 3')
V3-V4	470 bp	341F	CCTAYGGGRBGCASCAG
		806R	GGACTACNNGGG-TATCTAAT
V4-V5	450 bp	515F	GTGCCAGCMGCCGCGG-TAA
		907R	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT

*Los tamaños de los fragmentos se tomaron en cuenta para la verificación de la amplificación en gel de agarosa , ambigüedades están representadas con las letras R = A o G, Y = C o T, S = G o C, M = A o C y N = Cualquier base.

Para la región V3-V4 las condiciones de la PCR fueron (i) 1 min a 98°C, (ii) 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C y (iii) 5 min a 72°C (Mei et al., 2022). Por otro lado, para la región V4-V5 las condiciones fueron (i) 3 min a 98°C, (ii) 25 ciclos de 15 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C y (iii) 5 min a 72°C (Wang et al., 2020). Por último, la PCR fue llevada a cabo en un termociclador SimpliAmp™ (ThermoFisher) y los productos amplificados fueron analizados en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE. Después de obtener unas bandas bien marcadas con la longitud deseada, se procedió a añadir mediante otra PCR colas de nucleótidos para la secuenciación de las muestras mediante tecnología de secuenciación Nanopore. Esta PCR se la hizo con los mismos primers , los cuales contenían una cola de nucleótidos extra para ser agregados y el número de ciclados bajo a 25 para cada primer.

2.2.3 Preparación de librería y secuenciación con MinION.

La secuenciación y preparación de la librería para el MinION nanopore se llevó a cabo con el método de ligación 1D con el kit (SQK-LSK109) y la colocación de códigos de barras se realizó con el kit (EXP-PBC001). El protocolo se siguió de acuerdo al fabricante (Oxford nanopore technologies) con las siguientes modificaciones: la concentración de muestras agregada fue 30 ng/μl para un total de volumen de reacción de 50uL para la PCR sugerida en el protocolo.

Una vez agregados los códigos de barra el proceso de purificación de los amplicones se lo realizó con el kit PureLink PCR Purification Kit de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen). Para cuantificar el ADN se usó el fluorómetro Qbit2.0 (Invitrogen), después el protocolo de secuenciación de acuerdo con Oxford nanopore technologies se mantuvo.

Se realizó una prueba de calidad en el MinION de una MinIon/GridIon flow cell (Versión R9) para verificar si el número de poros disponibles era el adecuado. Una vez pasada la prueba de calidad se preparó y se cargó la flow cell con 75 μl (31 ng/μl) de la librería preparada anteriormente. Finalmente, se corrió el programa y se secuenció por aproximadamente 24 horas a -180 mV en modo high accuracy bascalling y con quality check mayor a 9.

2.2.4 Análisis de datos de secuenciación masiva de nueva generación.

Una vez terminada la secuenciación los datos se pasaron a un disco duro externo en formato Fasta. El análisis de datos se llevó a cabo en la plataforma EPI2ME (Oxford Nanopore Technologies) de acuerdo al protocolo para la identificación de bacterias por el gen 16S rRNA. En este análisis se toma en cuenta la base de datos del NCBI, en el cual las lecturas de la secuenciación son clasificadas hasta un nivel de género solamente mediante la información provista por los resultados de un BLAST. Lao et al. (2022) sugieren una cobertura e identidad del 90%, sin embargo, en este caso se decidió utilizar ambas al 95 %, ya que el 5% se puede considerar un error en la secuenciación. Cabe mencionar que con este análisis también fue posible obtener la abundancia de los géneros bacterianos, puesto que el número de lecturas clasificadas es proporcional a la abundancia bacteriana en la muestra de acuerdo con la plataforma.

3. Resultados

3.1 Detección de comunidades bacterianas aerobias susceptibles a antibióticos.

Una vez alcanzado el estado estacionario en cada tasa de dilución, cada tubo de ensayo con cultivo fue tratado con un antibiótico para comparar el cambio de densidades ópticas antes y después del tratamiento con el respectivo antibiótico. En la **Figura 2**, se puede observar la razón DO normalizada de cada antibiótico a las 24 horas, ya que la dosis utilizada era para ese período de tiempo. En la primera tasa de dilución (0.042 h^{-1}), observamos la amoxicilina con una razón DO normalizada de 0.73, la gentamicina con una razón DO normalizada de 0.98 y la ceftriaxona con un 0.92. Por otro lado, la amikacina y ampicilina son los antibióticos que tuvieron una razón mayor a 1, con una razón DO normalizada de 1.02 y 2.38, respectivamente. Es decir, no hubo susceptibilidad al antibiótico, según la tabla de interpretación (**Anexo 2**).

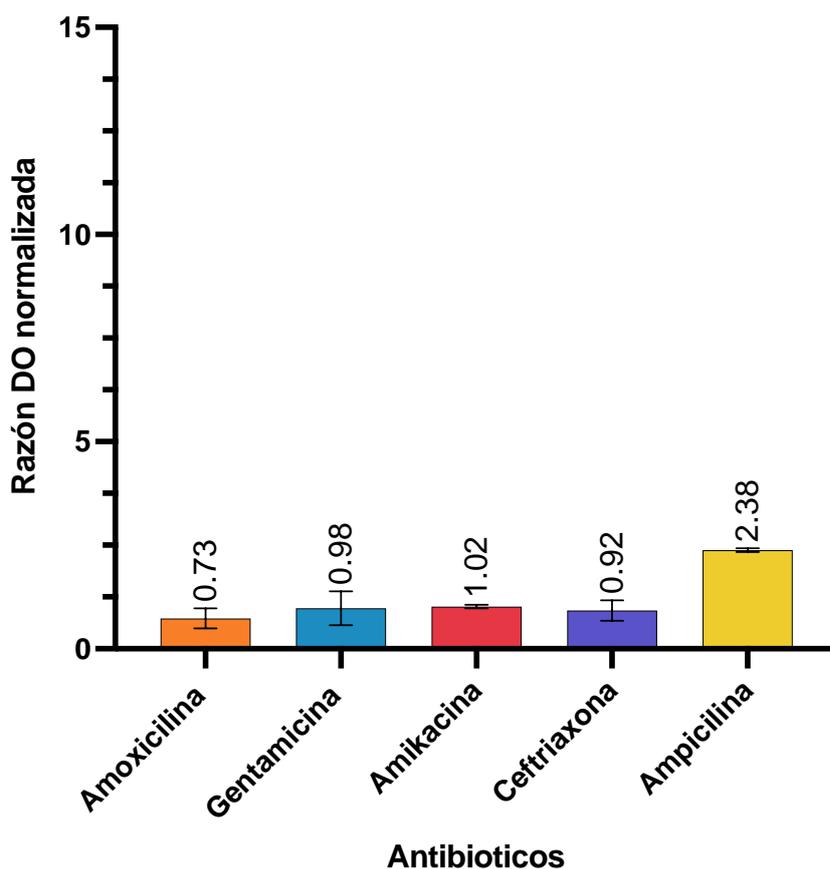


Figura 2. Razones DO normalizadas en la tasa de dilución 0.042 h^{-1} . Las barras representan los promedios las razones DO normalizadas de ambas réplicas, su valor se encuentra por encima de las barras de error; adicionalmente la figura muestra la desviación estándar de cada muestras: amoxicilina ± 0.24 , gentamicina ± 0.4 , amikacina ± 0.04 , ceftriaxona de ± 0.24 y ampicilina de ± 0.04 .

Por otra parte, en la tasa de dilución de 0.4 h^{-1} (**Figura 3**) tenemos los 5 antibióticos, amoxicilina, gentamicina, amikacina, ceftriaxona, ampicilina, en los cuales las razones DOs normalizadas fueron: 3.78, 5.58, 3.31, 3.33, 4.44, respectivamente. Esto quiere decir que existe un aumento en la masa bacteriana en cada tubo con tratamiento en comparación con el control. En otras palabras, todas las muestras no mostraron susceptibilidad a los antibióticos (**Anexo 2**).

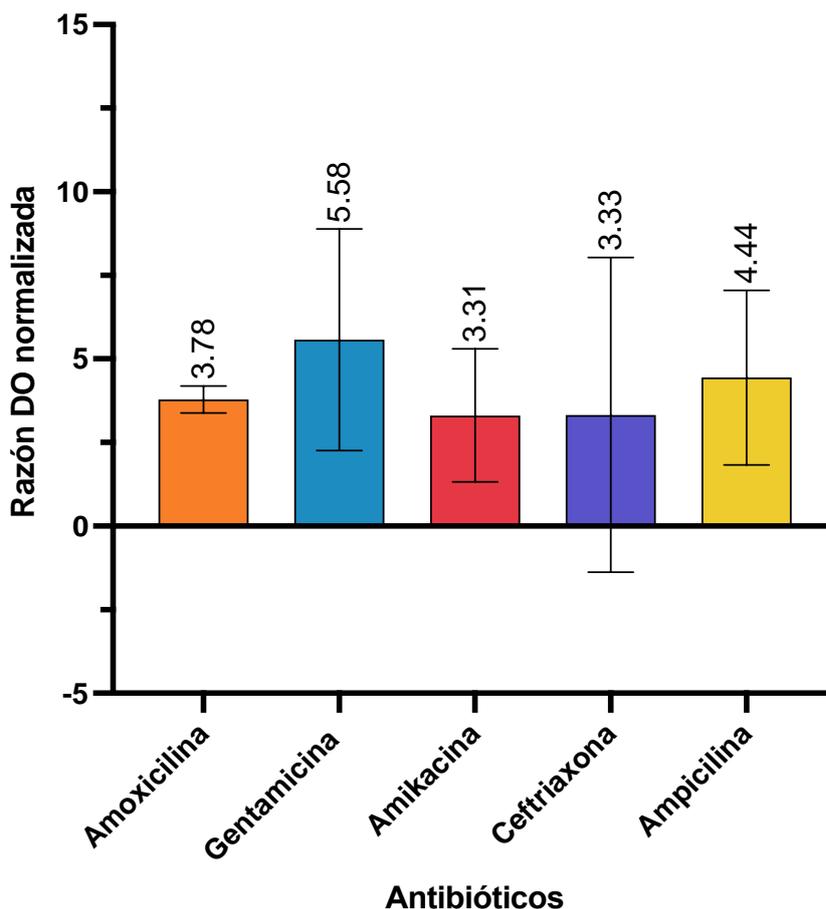


Figura 3. Razones DO normalizadas en la tasa de dilución $0,4 \text{ h}^{-1}$. Las barras representan los promedios las razones DO normalizadas de ambas réplicas, su valor se encuentra por encima de las barras de error; adicionalmente la figura muestra la desviación estándar de cada muestras: amoxicilina ± 0.41 , gentamicina ± 3.31 , amikacina ± 1.99 , ceftriaxona de ± 4.70 y ampicilina de ± 2.62 .

Finalmente, en la última tasa de dilución de 0.6 h^{-1} en el caso de la amoxicilina tenemos valores de razones DOs normalizadas de 3.61, la gentamicina con 3.79, amikacina con 1.47, ceftriaxona con 0.79 y por último la ampicilina con 5.05. En ese caso, la ceftriaxona a pesar que tiene su razón DO normalizada menor a 1; es decir, mostro susceptibilidad al antibiotico, es el antibiótico con menos desviación estándar, por lo tanto con menos incertidumbre en sus datos (**Figura 4, Anexo 2**). En el transcurso del experimento, en el caso de la ampicilina y amoxicilina debido a su composición blanquecina, se decidió no tomarlas en cuenta para el análisis molecular, ya que la medición de la densidad óptica pudo ser alterada por este motivo.

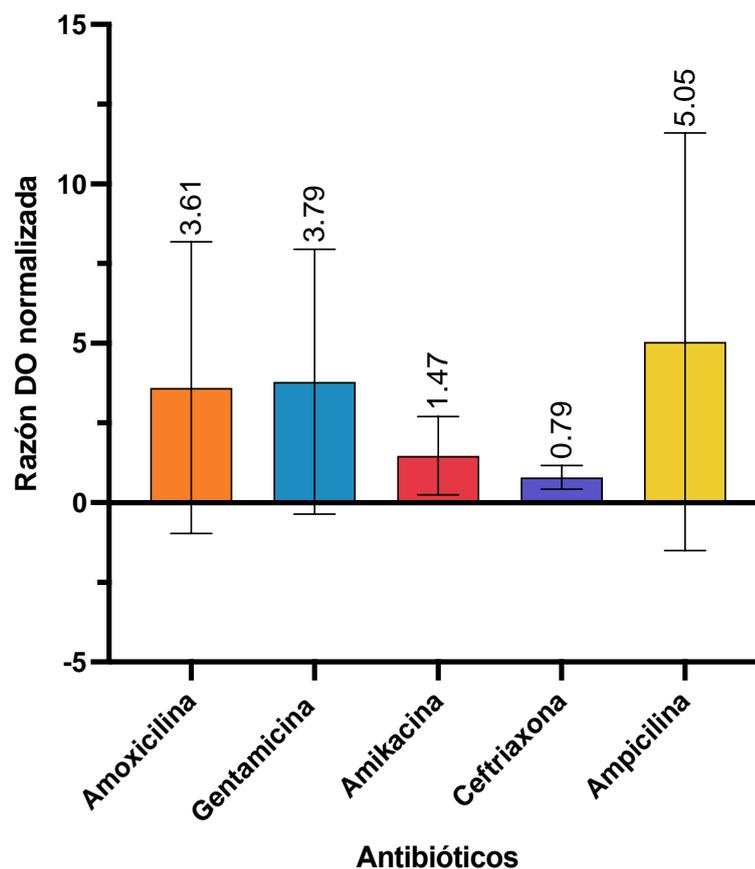


Figura 4. Razones DO normalizadas en la tasa de dilución $0,6 \text{ h}^{-1}$. Las barras representan los promedios las razones DO normalizadas de ambas réplicas, su valor se encuentra por encima de las barras de error; adicionalmente la figura muestra la desviación estándar de cada muestra: amoxicilina ± 4.58 , gentamicina ± 4.16 , amikacina ± 1.23 , ceftriaxona de $\pm 0,37$ y ampicilina de $\pm 6,55$

3.2 Identificación de comunidades bacterianas por secuenciación con nanoporos.

Después de analizar las razones DOs normalizadas de cada tasa de dilución y medir la cantidad y calidad del material genético de cada muestra, se decidió secuenciar las muestras de la tasa de dilución más alta, $0,6 \text{ h}^{-1}$, ya que a una mayor tasa de dilución, la concentración microbiana cambia rápidamente y solo las bacterias con una alta tasa de crecimiento lograrán adaptarse. Esto es relevante ya que estas bacterias al reproducirse con mayor rapidez pueden ser las causantes de enfermedades las cuales necesitan de un tratamiento oportuno y específico para el tipo de bacteria. Es por esto que se eligió la gentamicina con una razón DO normalizada mayor a 1 y la ceftriaxona, que a pesar de no tener una razón DO normalizada mayor a 1 es la muestra con menor desviación estándar y una clase de antibiótico a la cual ya se reporta resistencia en el Ecuador (Ministerio de Salud Pública, 2018). Primero, se obtuvo la abundancia relativa de las muestras de ambos reactores. Recordemos que en este caso la abundancia relativa es proporcional al número de lecturas; es decir, el número de lecturas representa la cantidad de bacterias en cada género en la muestra. En el caso de la muestra tratada con ceftriaxona se obtuvieron 257885 lecturas secuenciadas, de las cuales el 20% que corresponde a 51412 lecturas fueron clasificadas con una precisión media del 97%. De todos los géneros clasificados se tomó en cuenta los 9 géneros más abundantes, los cuales se encuentran representados en la **Figura 5A**, donde el género *Stenotrophomas*

registra 14545 lecturas (28.29%), es decir es el más abundante en toda la muestra. Al contrario, el género *Acetobacteria* con 634 lecturas clasificadas representa el 1.23% del total.

En el caso de la gentamicina tenemos 294633 lecturas provenientes de la secuenciación por nanoporos de las cuales el 17% (49923) fueron clasificadas por la plataforma Epi2me con una precisión media del 97%. De las lecturas clasificadas, el género más abundante fue la *Stenotrophomonas* con 11356 lecturas que corresponde al 22.75 %. Por otra parte, en esta muestra el noveno género más abundante fue el género *Bifidobacterium spp.* con 776 lecturas clasificadas lo que corresponde al 1.55% (**Figura 5B**).

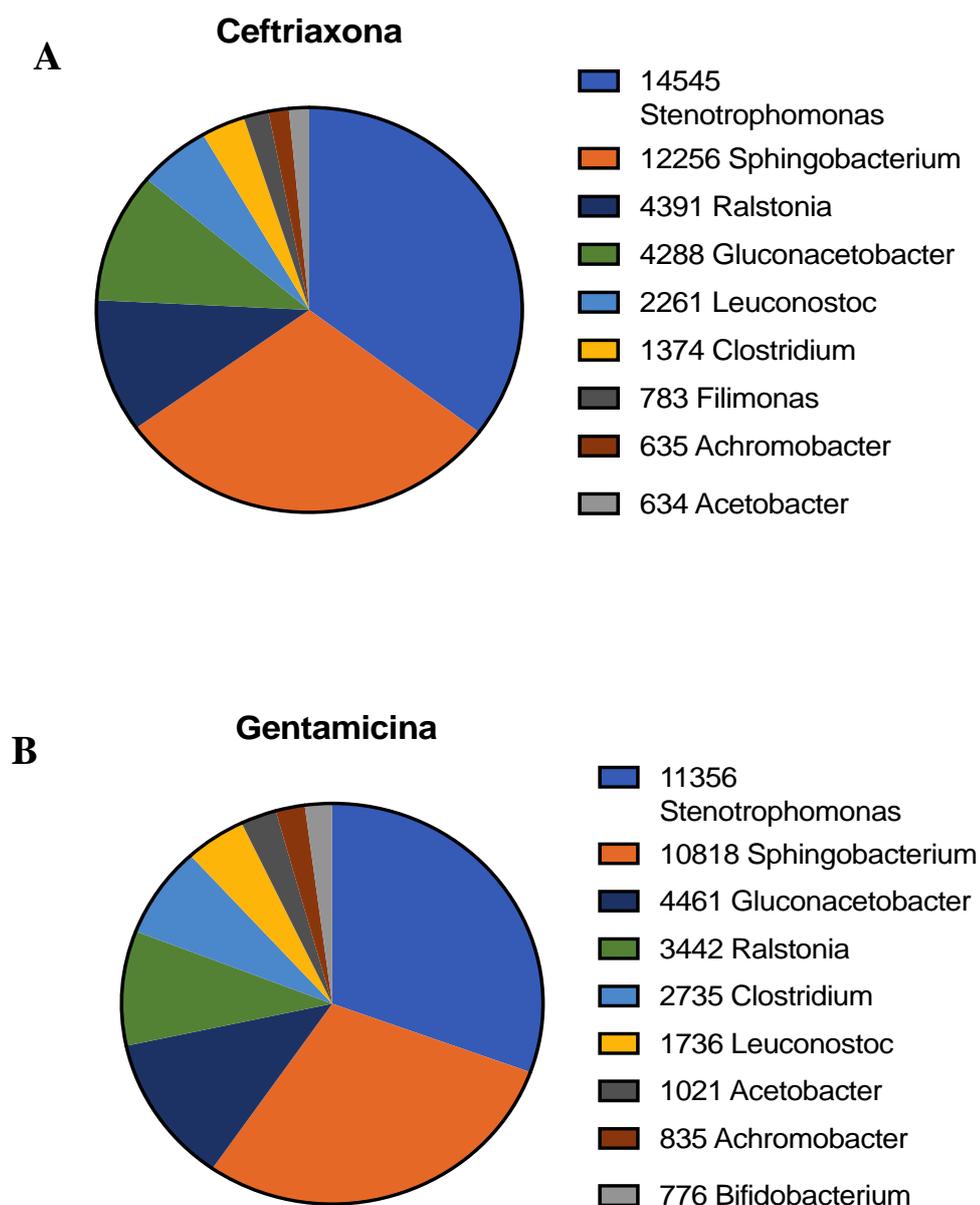


Figura 5. Número de lecturas de cada género de bacterias en muestras secuenciadas en MiniOn A) Número de lecturas (abundancia) de cada género de la muestra tratada con ceftriaxona, cada leyenda representa un género con su respectivo número de lecturas. B) Número de lecturas de cada género (abundancia) de la muestra tratada con gentamicina, cada leyenda representa un género con su respectivo número de lecturas, es decir su abundancia relativa en la muestra.

4. Discusión

Las bacterias son organismos que necesitan adaptarse a su ambiente para sobrevivir, muchos de los antibióticos son producidos naturalmente por las mismas bacterias o por hongos. Es por esto, que algunas bacterias crearon mecanismos para evadir la acción de los antibióticos y poder sobrevivir y reproducirse (Felden & Cattoira, 2018). Sin embargo, la problemática empieza cuando estos mecanismos de resistencia son transmitidos a bacterias patógenas, las cuales pueden causar daño a su huésped y al mismo tiempo éstas pueden ser transmitidas a otros seres vivos, lo que causaría el mal tratamiento de enfermedades infecciosas y aumentaría el costo del tratamiento a largo plazo (Capita & Alonso-Calleja, 2013). Además, debemos tener en cuenta que las técnicas convencionales de susceptibilidad actuales trabajan en cultivos puros, necesitan una gran cantidad de células viables para ser detectadas y no permiten ejercer algún tipo de selección en la comunidad bacteriana (Kelley, 2017). Brown et al. (1990) destacan que la susceptibilidad a diferentes antibióticos puede verse afectada con el cambio en la tasa de crecimiento de la bacteria. Por ejemplo, en el caso de un cultivo continuo de *E. Coli* se observó que la susceptibilidad a la clorhexidina se veía afectada de diferente forma por la tasa de crecimiento de la bacteria y un nutriente limitante. En el caso de cultivos con el magnesio y potasio como nutriente limitante, se obtuvo un incremento de resistencia mientras existió un incremento en la tasa de crecimiento del cultivo.

Nuestros resultados muestran que a una alta tasa de dilución (0.6 h^{-1}) no existe susceptibilidad a la mayoría de antibióticos con excepción de la ceftriaxona con una razón DO normalizada de 0.79. Sin embargo, debido a los continuos reportes de resistencia bacteriana a este tipo de antibiótico, especialmente en el Ecuador y por su baja desviación estándar ($\pm 0,37$) en esta tasa de dilución en específico, la muestra de este antibiótico se tomó en cuenta para los análisis moleculares. Esta tasa de dilución es importante ya que aquí se encuentran bacterias con una alta tasa específica de crecimiento. Estas bacterias son de importancia ya que son bacterias que se adaptan rápidamente a la presión selectiva impuesta en ellas, en este caso, la tasa de dilución. Por otro lado, estas bacterias pueden ser causantes de enfermedades las cuales por su rápida tasa de crecimiento se esparzan en el sistema de manera inmediata. Además, cabe recalcar que imponer presión selectiva en bacterias tratadas con antibióticos puede generar resistencia, ya que las bacterias que sobreviven, se reproducen y generan descendencia ya con resistencia al antibiótico (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

Para corroborar que las bacterias aisladas fueron bacterias con resistencia a antimicrobianos los análisis moleculares con la secuenciación nos dieron la identidad de los géneros más abundantes en los inóculos tratados con ceftriaxona y gentamicina, una cefalosporina y aminoglucósido, respectivamente. En ambas lecturas podemos ver que el género más abundante son las *Stenotrophomas spp*, las cuales si están relacionadas con agentes patógenos. Las especies de bacterias pertenecientes a este género se encuentran distribuidas en el ambiente y también se las puede encontrar como patógenos oportunistas (Cerezer et al., 2014). McCutcheon & Dennis, (2021) y An & Berg (2018) presentan a la especie *Stenotrophomonas maltophilia* como un organismo oportunista, el mismo que se conoce por su multiresistencia y la causante de enfermedades nosocomiales en pacientes pediátricos e inmunocomprometidos. Cabe recalcar que la importancia de esta especie es porque se la puede encontrar distribuida en el ambiente y en las últimas dos décadas se ha convertido en sujeto de preocupación a nivel clínico. Los mecanismos de resistencia de esta bacteria hacen que su tratamiento sea complicado; sin embargo, en algunos casos se recomienda la combinación de antibióticos para su eliminación, entre estos las cefalosporinas (Gibb & Wong, 2021). De igual manera se tiene a la especie *Stenotrophomona pavanni*, la cual no tiene tantos reportes a nivel clínico, pero ha sido reportada como multi-resistente de una muestra de las heces de un ave (Kenzaka & Tani, 2018).

Por otro lado, el segundo género más abundante en ambas muestras es el *Spingobacterium* spp, este género se encuentra en los suelos y vegetación; este no está asociado directamente con generar enfermedades en humanos. De todas maneras, sí está reportado que tiene una resistencia intrínseca a la gentamicina en específico (Gupta et al., 2016; Liu et al., 2008). Uno de los tratamientos para este género bacteriano es el uso de cefalosporinas, en este caso, podemos asumir que tuvimos una resistencia de esta clase de bacterias ante el tratamiento, ya que la diana específica del antibiótico no eliminó este género de la muestra en cuestión. Gupta et al. (2016) realizaron un estudio en el cual la especie *Sphingobacterium spiritivorum* logró infectar a un paciente con enfermedad renal, al ser una bacteria oportunista estas bacterias podrían comenzar a infectar otras especies con más facilidad. En este punto cabe recalcar que el paso de esta especie a ser patógena podría causar el aumento de casos de la misma en especial en pacientes inmunocomprometidos.

Asimismo, en base a los resultados obtenidos podemos observar que el quimiostato seguido de la prueba de susceptibilidad a antibióticos, es capaz de aislar bacterias susceptibles a antimicrobianos en una comunidad bacteriana, sin necesidad de hacer subcultivos para obtener cepas puras y nos permite ejercer una presión selectiva en el medio de cultivo para aislar bacterias que crezcan a altas tasas de crecimiento. Además, una de las ventajas del quimiostato es la simulación de un ambiente fisiológico, como puede ser el torrente sanguíneo. Kelley (2017) menciona que las infecciones causadas por bacterias en el torrente sanguíneo pueden causar una sepsis, por lo cual un tratamiento oportuno con antibióticos efectivos es necesario para incrementar la supervivencia del paciente. Por otro lado, Adamberg & Adamberg (2018) mencionan que el uso de un quimiostato puede simular in vitro el ambiente de la microbiota intestinal, y que la modificación de la tasa de dilución puede tener efectos en el tipo de comunidades bacterianas que se establecen en el colon. Agregado a lo anterior, uno de los beneficios del uso de este sistema es el bajo costo para montar un biorreactor y su fácil operación.

Sin embargo, a pesar de los beneficios que tenemos al usar un biorreactor para la detección de bacterias resistentes a antibióticos, como desventajas que se han presentado en el transcurso del estudio tenemos el tiempo que puede demorar el proceso de inoculación e incubación antes de empezar con la prueba de susceptibilidad a los antibióticos. En el caso de la selección de antibióticos se observó que el uso de antibióticos transparentes sería lo más óptimo para evitar ruido en la lecturas de densidad óptica, lo cual sería una desventaja, ya que limitaría el estudio a solo un tipo de antibióticos.

Finalmente, dado que las bacterias susceptibles a los antibióticos usados en este estudio fueron encontradas en alimentos provenientes de mercados de la ciudad; esto sugiere el control del uso de antibióticos en productos alimenticios, así como en animales usados para el consumo humano. La implementación de normas para evitar el uso desmedido de estos antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades en animales o para su crecimiento. El MSP, sugiere la implementación de subcomités para el control y vigilancia de estos microorganismos (Ministerio de Salud Pública, 2018). Sin embargo, se sugiere prestar atención en el área de agricultura, ganadería y pesca para comenzar con planes de control del uso de antibióticos desde una de las fuentes que pueden causar la adquisición de estas bacterias resistentes

5. Conclusión

En base a lo mencionado anteriormente y con los resultados presentados se puede llegar a la conclusión que el nuevo sistema quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos nos permite la detección de comunidades bacterianas aerobias multiresistentes a antibióticos, además que presentan altas velocidades específicas de crecimiento en matrices alimenticias.

Asimismo, se observó que a diferentes tasas de dilución el quimiostato de fase simple es capaz de aislar bacterias las cuales después mostraron no susceptibilidad a los diferentes antibióticos.

Por último, mediante la secuenciación masiva de tercera generación se logró identificar los géneros bacterianos con más abundancia en las muestras que no mostraron susceptibilidad y se corroboró que se trataban de bacterias las cuales ya tienen un historial de multiresistencia.

Contribución de los Autores: “Conceptualización AG; metodología DL; análisis formal; recursos AG, DL; escritura—preparación de borrador o draft original, DL escritura-revisión y edición, DL, AG; visualización final, AG, DL.; supervisión, AG.; administración y gestión de proyecto, AG.; adquisición de fondos, AG. “Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito”.

Financiamiento: “Esta investigación fue financiada por la DII-UISEK-P000000

Conflictos de Interés: “Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

Referencias citadas

- Acevedo, F., Gentina, J. C., & Illanes, A. (2002). Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. In *Fundamentos de ingeniería bioquímica*.
- Adamberg, K., & Adamberg, S. (2018). Selection of fast and slow growing bacteria from fecal microbiota using continuous culture with changing dilution rate. *https://doi.org/10.1080/16512235.2018.1549922*, 29(1), 1549922. <https://doi.org/10.1080/16512235.2018.1549922>
- Allen, R. J., & Waclaw, B. (2019). Bacterial growth : a statistical physicist ' s guide. *Rep Prog Phys*, 82(1), 1–55. <https://doi.org/10.1088/1361-6633/aae546>.Bacterial
- An, S. qi, & Berg, G. (2018). Stenotrophomonas maltophilia. *Trends in Microbiology*, 26(7), 637–638. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.04.006>
- Brown, M. R. W., Collier, P. J., & Gilbert, P. (1990). Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(9), 1623. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.9.1623>
- Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Cerezer, V. G., Bando, S. Y., Pasternak, J., Franzolin, M. R., & Moreira-Filho, C. A. (2014). Phylogenetic Analysis of Stenotrophomonas spp. Isolates Contributes to the Identification of Nosocomial and Community-Acquired Infections. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/151405>
- Chen, J., Ying, G. G., & Deng, W. J. (2019). Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(27), 7569–7586.

<https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B01334>

- Felden, B., & Cattoira, V. (2018). Bacterial Adaptation to Antibiotics through Regulatory RNAs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.02503-17/ASSET/A8FFB7C1-E279-4C1D-AB55-3B6E74BD7D24/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0051871640001.JPEG>
- Feng, Y., Bakker, R. T., van Hest, R. M., Hodiament, C. J., Brul, S., Schultsz, C., & ter Kuile, B. H. (2017). Optimization of therapy against *Pseudomonas aeruginosa* with ceftazidime and meropenem using chemostats as model for infections. *FEMS Microbiology Letters*, 364(14). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx142>
- Feng, Y., Hodiament, C. J., Van Hest, R. M., Brul, S., Schultsz, C., & Ter Kuile, B. H. (2016). Development of antibiotic resistance during simulated treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in chemostats. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149310>
- Fluit, A. C., Visser, M. R., & Schmitz, F. J. (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 836. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.836-871.2001>
- Gibb, J., & Wong, D. W. (2021). Antimicrobial Treatment Strategies for *Stenotrophomonas maltophilia*: A Focus on Novel Therapies. *Antibiotics*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10101226>
- Gómez, T. O. (2016). *Evaluation of the bacterial load and antibiotic resistance of isolated of marine bacteria in marine areas of high influence of larval production in Ecuador.*
- Gupta, A., Logan, J., Elhag, N., & Almond, M. (2016). *Sphingobacterium spiritivorum* infection in a patient with end stage renal disease on haemodialysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 10–13. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0141-5>
- Hall, G., & Carroll, K. C. (2016). Selected Topics in Aerobic Bacteriology. *Microbiology Spectrum*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.dmih2-0027-2016>
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica Del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33–41. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Hughes, D., & Andersson, D. I. (2017). Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Issue 3, pp. 374–391). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux004>
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Kelley, S. O. (2017). New Technologies for Rapid Bacterial Identification and Antibiotic Resistance Profiling. In *SLAS Technology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 113–121). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/2211068216680207>
- Kenzaka, T., & Tani, K. (2018). Draft Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas*

- pavanii BWK1, Isolated from *Mareca penelope* Feces. *Genome Announcements*, 6(12). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00187-18>
- Lao, H. Y., Ng, T. T. L., Wong, R. Y. L., Wong, C. S. T., Lee, L. K., Wong, D. S. H., Chan, C. T. M., Jim, S. H. C., Leung, J. S. L., Lo, H. W. H., Wong, I. T. F., Yau, M. C. Y., Lam, J. Y. W., Wu, A. K. L., & Siu, G. K. H. (2022). The Clinical Utility of Two High-Throughput 16S rRNA Gene Sequencing Workflows for Taxonomic Assignment of Unidentifiable Bacterial Pathogens in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(1). <https://doi.org/10.1128/JCM.01769-21>
- Lehtinen, S., Blanquart, F., Lipsitch, M., & Fraser, C. (2019). On the evolutionary ecology of multidrug resistance in bacteria. *PLoS Pathogens*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007763>
- Liu, R., Liu, H., Zhang, C. X., Yang, S. Y., Liu, X. H., Zhang, K. Y., & Lai, R. (2008). *Sphingobacterium siyangense* sp. nov., isolated from farm soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1458–1462. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65696-0>
- Lowe, J. (1982). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 17(C), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)60495-9](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)60495-9)
- McCutcheon, J. G., & Dennis, J. J. (2021). The potential of phage therapy against the emerging opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/v13061057>
- Ministerio de Salud Pública. (2018). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador. In *Ministerio de Salud Pública* (Vol. 2, Issue 1). https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 31, Issue 4). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Seo, M. K., Na, K. W., Han, S. H., Park, S. H., & Ha, S. Do. (2020). Inhibitory effect of ethanol and thiamine dilaurylsulfate against loosely, intermediately, and tightly attached mesophilic aerobic bacteria, coliforms, and *Salmonella Typhimurium* in chicken skin. *Poultry Science*, 99(3), 1571–1580. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.058>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: causes and threats. *P & T Journal*, 40(4), 277–283. <https://doi.org/Article>

Figura 1A. Biorreactor montado en el laboratorio de la Universidad.

Anexo 2

Tablas interpretativas de susceptibilidad a antibióticos

Tabla1A.

Tabla de interpretación de suceptibilidad tasa de dulución 0.042

	Razón Amoxicilina	Razón control	Razón OD normalizada	Interpretación
24 horas	0,777	1,071	0,726	Suceptible
	Razón Gentamicina			
	1,032		0,963	Suceptible
	Razón Amikacina			
	1,087		1,015	No suceptible
	Razón Ceftriazona			
	0,979		0,914	Suceptible
	Razón Ampicilina			
	2,553	2,382	No suceptible	

*La interpretación es basada en comparación al control, sin embargo para pasar a las pruebas moleculares , se tomó en cuenta otros factores, como la veracidad de los datos y la naturaleza del antibiotico en cuestion.

Tabla 2A.

Tabla de interpretación de suceptibilidad tasa de dulución 0.4

	Razón Amoxicilina	Razón control	Razón OD normalizada	Interpretación
24 horas	0,538	0,145	3,78	No suceptible
	Razón Gentamicina			
	0,716		5,58	No suceptible
	Razón Amikacina			
	0,537		3,31	No suceptible
	Razón Ceftriazona			
	0,350		3,33	No suceptible
	Razón Ampicilina			
	0,710	4,44	No suceptible	

*La interpretación es basada en comparación al control, sin embargo para pasar a las pruebas moleculares, se tomó en cuenta otros factores, como la veracidad de los datos y la naturaleza del antibiótico en cuestión.

Tabla 3A.

Tabla de interpretación de susceptibilidad tasa de dilución 0.6

	Razón Amoxicilina	Razón control	Razón OD normalizada	Interpretación
24 horas	0,72	0,63	3,61	No susceptible
	Razón Gentamicina			
	0,98		3,79	No susceptible
	Razón Amikacina			
	0,51		1,47	No susceptible
	Razón Ceftriazona			
	0,37		0,79	No susceptible
	Razón Ampicilina			
	0,96	5,05	No susceptible	

*La interpretación es basada en comparación al control, sin embargo para pasar a las pruebas moleculares, se tomó en cuenta otros factores, como la veracidad de los datos y la naturaleza del antibiótico en cuestión.

Anexo 3

Geles agarosa 1.5% de amplicones 16s rRNA con regiones hipervariables.

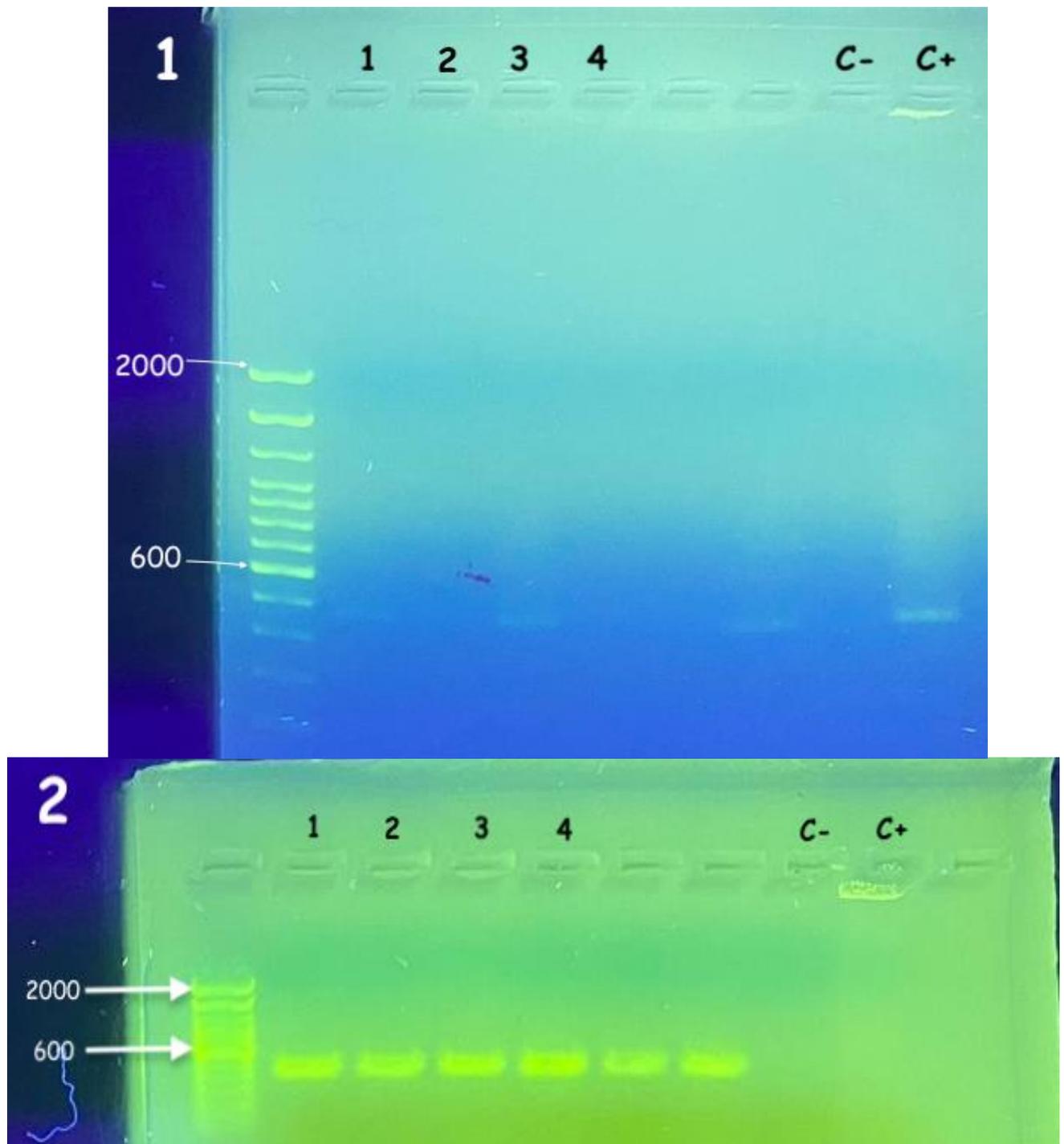


Figura 2A. Geles de agarosa al 1.5% teñidos con Safe View™ Classic y Ladder Tackit™ cyan/Orange. 1. Carga con primer V3-V4 con una banda a los 470bp aproximadamente, en los primeros dos carriles tenemos las muestras de ceftriaxona y en los rieles 3 y 4 las muestras tratadas con gentamicina. 2. Primers V4-V5 con una banda a los 450bp aproximadamente, en los rieles 1 y 2 tenemos las muestras tratadas con ceftriaxona y en los rieles 3 y 4 tenemos las muestras tratadas con gentamicina.