

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRIA EN BIOMEDICINA

Trabajo de Fin de Maestría Titulado:

Evaluación de un nuevo sistema tecnológico para la detección de comunidades bacterianas anaerobias con multiresistencia a antibióticos y que presenten altas velocidades específicas de crecimiento.

Realizado por:

Leslie Tatiana Morales Pedraza

Director del proyecto:

Alberto Aguirre, PhD

Como requisito para la obtención del título de:

Master en Biomedicina

Quito, 2022

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, LESLIE TATIANA MORALES PEDRAZA, con cédula de identidad # 1725635724, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o 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

1725635724

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“Evaluación de un nuevo sistema tecnológico para la detección de comunidades bacterianas anaerobias con multiresistencia a antibióticos y que presenten altas velocidades específicas de crecimiento”

Realizado por:

LESLIE TATIANA MORALES PEDRAZA

Como Requisito para la Obtención del Título de:

MAESTRIA EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

ALBERTO AGUIRRE BRAVO, Ph.D.

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

José Rubén Ramírez Iglesias, Ph.D.

Dr. Andrés Ignacio Contreras Piérola.

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



FIRMA



FIRMA

Quito, 10 de Agosto del 2022

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a Dios y a la Virgen María por ser mi guía y mi luz en todo momento; a mis padres Yolanda y Romulo por ser mi pilar, mi fortaleza, por no dejarme dar por vencida ante las adversidades y por brindarme el apoyo y paciencia incondicional en el camino de este eslabón más de mi formación académica. Que Dios me permita seguir creciendo junto a ustedes y que los bendiga por ser excelentes padres, los amo.

También les dedico a todas personas cercanas que han permitido que logre llegar hasta este paso en mi vida, que Dios les llene de bendiciones.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por darme la fuerza y la oportunidad de poder continuar creciendo profesionalmente. A mis padres que han luchado por brindarme la felicidad y el apoyo constante en mi educación.

También a la Universidad Internacional SEK por la oportunidad de formarme académicamente en la maestría, a sus docentes porque me inculcaron sus conocimientos, a mi tutor Alberto Aguirre, Ph.D por su apoyo para que este trabajo se pueda llevar a cabo, a José Rubén, Ph.D por su ayuda en el análisis molecular.

Índice General

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4.1	DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE MUESTREO.....	8
4.2	MUESTRAS DE ALIMENTOS DEL MERCADO DE QUITO.....	8
4.3	ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	8
4.4	PERIODO DE ACLIMATACIÓN.....	9
4.5	MONTAJE, PUESTA EN MARCHA Y OPERACIÓN DEL SISTEMA TECNOLÓGICO: QUIMIOSTATO SIMPLE DE UNA ETAPA SEGUIDO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.....	9
4.6	CONSERVACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIAS AISLADAS.....	11
4.7	PRUEBAS MOLECULARES.....	11
4.7.1	Extracción de ADN.....	12
4.7.2	Cuantificación de ADN.....	12
4.7.3	Amplificación de la región 16S rRNA.....	12
4.7.4	Secuenciación Metagenómica por MinION Mk 1C IT.....	13
4.7.4.1	Preparación de Librerías y Secuenciación.....	13
4.7.4.2	Análisis de Datos de la secuenciación metagenómica.....	14
4.8	ANÁLISIS DE LOS DATOS DEL NUEVO SISTEMA TECNOLÓGICO.....	14
5.	RESULTADOS.....	15
5.1	ENSAYO DEL SISTEMA TECNOLÓGICO QUIMIOSTATO SIMPLE DE UNA ETAPA SEGUIDO DE UN SISTEMA DETECCIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.....	15
5.2	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN EL QUIMIOSTATO NO SUSCEPTIBLES A ANTIBIÓTICOS.....	18
5.3	AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES HIPERVARIABLES (V3 – V4 Y V4 –V5) DE LA REGIÓN 16S rRNA.....	18
5.4	SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA DE LAS MUESTRAS.....	18
6.	DISCUSIÓN.....	20
7.	CONCLUSIONES.....	26
9.	REFERENCIAS.....	28

Índice de tablas

Tabla 1 Composición del medio de cultivo	8
Tabla 2 Ensayo de detección de susceptibilidad a antibióticos en comunidades bacterianas	10
Tabla 3 Componentes de la Master mix para la PCR.....	12
Tabla 4 Fases de ciclado de la región V3 - V4 y V4 - V5.....	13
Tabla 5 Interpretación de susceptibilidad a los antibióticos a una tasa de dilución baja de $0,042 h - 1$	16
Tabla 6 Interpretación de susceptibilidad a los antibióticos a una tasa de dilución de $0,4 h - 1$	16
Tabla 7 Interpretación de susceptibilidad de los antibióticos a una tasa de dilución de $0,6 h - 1$	17
Tabla 8 Muestras seleccionadas para la identificación molecular.....	18

Índice de Figuras

Figura 1 Montaje y operación del quimiostato simple de una etapa, del sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y análisis molecular.....	10
Figura 2 Índice de susceptibilidad de la comunidad bacteriana del quimiostato a una tasa de dilución de $0,042 h - 1$	15
Figura 3 Índice de susceptibilidad de la comunidad bacteriana del quimiostato a una tasa de dilución de $0,4 h - 1$	16
Figura 4 Índice de susceptibilidad de la comunidad bacteriana del quimiostato a una tasa de dilución de $0,6 h - 1$	17
Figura 6 Abundancia relativa de los géneros bacterianos presentes en la muestra con gentamicina.....	19
Figura 7 Abundancia relativa de los géneros bacterianos presentes en la muestra con amikacina.....	19

Índice de Anexos

Anexo 1 Ejemplo de cálculo de las dosis de antibiótico utilizado en el estudio.....	38
Anexo 2 Kit de extracción de ADN	39
Anexo 3 Kit de cuantificación del ADN	40
Anexo 4 Secuenciador MinION	41
Anexo 5 Amplificación de la región hipervariable V3-V4	42
Anexo 6 Amplificación de la región hipervariable V4-V5	43
Anexo 7 Amplificación de la región hipervariable V3-V4 de las muestras con cola	44
Anexo 8 Amplificación de la región hipervariable V4-V5 de las muestras con cola.....	45

1. Resumen

La resistencia a los agentes antimicrobianos es un problema mundial de preocupación, que ha provocado la rápida diseminación de las enfermedades infecciosas, amenazando con una alta tasa de mortalidad poblacional. Los métodos actuales para el estudio de bacterias con resistencia existentes en el mercado tienen varias desventajas, entre ellas que requieren una alta densidad poblacional bacteriana y solo estudian una cepa bacteriana, no la comunidad bacteriana. Debido a estas desventajas señaladas en este estudio se buscó evaluar un nuevo sistema tecnológico basado en un quimiostato simple de una etapa seguida de un sistema de susceptibilidad a antibióticos para detectar bacterias anaerobias resistentes a antibióticos.

Para esta investigación se tomó muestras de fuentes alimenticias provenientes de mercados, las cuales pasaron por un periodo de aclimatación y luego al sistema tecnológico (quimiostato simple de una etapa) para aislar las comunidades bacterianas con altas velocidades específicas de crecimiento. Posteriormente, las comunidades bacterianas aisladas en el quimiostato fueron analizadas con el ensayo de detección de susceptibilidad a antibióticos, donde se planteó una escala de mayor o igual a 1 no susceptibles y menor a 1 susceptibles. Las muestras con no susceptibilidad fueron analizadas con pruebas moleculares (secuenciación de nueva generación) para identificar las comunidades bacterianas y conocer si tienen antecedentes de resistencia o a su vez pueden ser reservorios de genes de resistencia a antibióticos.

Los resultados permitieron determinar que esta tecnología tiene la capacidad de aislar comunidades bacterianas con altas tasas de crecimiento lo que hace factible estudiar la resistencia a antibióticos de toda la muestra. Los antibióticos a los cuales las comunidades bacterianas no presentaron susceptibilidad fueron la ampicilina, la gentamicina, la ceftriaxona y la amikacina. Los géneros bacterianos más predominantes en las comunidades bacterianas no susceptibles a gentamicina y la amikacina fueron el *Clostridium* y el *Leuconostoc*. El primero puede actuar como patógeno y no patógeno habitando en el organismo de los seres vivos y el segundo es ácido láctico por lo que es un microorganismo de ecología láctea, alimentaria y ambiental. Los dos géneros han mostrado en investigaciones presencia de genes de resistencia a los antimicrobianos, por lo que su presencia en los alimentos es alarmante.

Palabras clave:

Comunidades bacterianas, antibióticos, resistencia, susceptibilidad y quimiostato.

2. Abstract

Resistance to antimicrobial agents is a global problem of concern, which has caused the rapid spread of infectious diseases, threatening a high population mortality rate. Current methods for the study of bacteria with resistance on the market have several disadvantages, including that they require a high bacterial population density and only study one bacterial strain, not the bacterial community. Due to these disadvantages pointed out in this study, we sought to evaluate a new technological system based on a simple one-stage chemostat followed by an antibiotic susceptibility system to detect antibiotic-resistant anaerobic bacteria.

For this research, samples of food sources from markets were taken, which went through an acclimatization period and then to the technological system (simple one-stage chemostat) to isolate bacterial communities with high specific growth rates. Subsequently, the bacterial communities isolated in the chemostat were analyzed with the antibiotic susceptibility detection assay, where a scale of greater than or equal to 1 non-susceptible and less than 1 susceptible was proposed. Non-susceptible samples were analyzed with molecular tests (next-generation sequencing) to identify bacterial communities and determine whether they have a history of resistance or, in turn, may be reservoirs of antibiotic resistance genes.

The results allowed us to determine that this technology has the capacity to isolate bacterial communities with high growth rates, which makes it feasible to study the resistance to antibiotics of the entire sample. The antibiotics to which the bacterial communities did not show susceptibility were ampicillin, gentamicin, ceftriaxone and amikacin. The most predominant bacterial genera in the bacterial communities not susceptible to gentamicin and amikacin were *Clostridium* and *Leuconostoc*. The first can act as a pathogen and non-pathogen inhabiting the body of living beings and the second is lactic acid, so it is a microorganism of dairy, food and environmental ecology. The two genera have shown in research the presence of antimicrobial resistance genes, so their presence in food is alarming.

Key words:

Bacterial communities, antibiotics, resistance, susceptibility and chemostat.

3. Introducción

La resistencia a antibióticos (RAM) es catalogada como la capacidad que tienen los microorganismos para resistir los efectos de los antimicrobianos (Calderón & Aguilar, 2016). Esta es considerada una de las principales amenazas de la salud mundial, que cada día se incrementa por falta de controles y estudios en países con economía baja y mediana. Una de las vías de transmisión de los microorganismos al ser humano es la cadena alimenticia. Estos generan enfermedades infecciosas y otras no patogénicas que habitan en la microbiota intestinal, actuando como reservorio de genes de resistencia, que a la larga producen la muerte de millones de personas de forma anual ((*Barletta et al.*, 2018); (*Ruiz et al.*, 2018)).

Estas bacterias resistentes a antibióticos han provocado problemas en el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes por su rápido crecimiento y propagación a nivel mundial, que amenazan un decrecimiento de la población para el 2050 mayor al de las enfermedades cancerígenas, por lo que es indispensable realizar un monitoreo constante en cada país para alertar a la comunidad mundial y generar nuevos tratamientos ((*Le et al.*, 2018); (*Pardo et al.*, 2018)).

En la actualidad las bacterias multiresistentes y genes de resistencia a antibióticos se encuentran distribuidas en todos los ambientes desde fuentes de agua, en la agricultura, en la ganadería y en el área de la salud, por lo que se consideran contaminantes que pueden provocar enfermedades graves y mortales en los seres vivos (*Yuan et al.*, 2021).

Los alimentos son una fuente primordial en la dieta del ser humano, pero también pueden conllevar a problemas de resistencia a antibióticos (RAM), en especial los productos provenientes de animales, ya que los veterinarios les administran antibióticos, como promotores de crecimiento, con función terapéutica o a su vez para prevenir problemas a futuro en los animales ((*Lavilla Lerma et al.*, 2013); (*Díaz-Jiménez et al.*, 2020); (*Núñez et al.*, 2020)).

Otra de las causas de resistencia a antibióticos es el uso inadecuado por parte del ser humano para tratar enfermedades que no son bien diagnosticadas o a su vez por automedicación, lo que ha provocado el surgimiento de microorganismos resistentes y la disminución de la eficacia de los antimicrobianos, los mismos que pueden causar altas tasas de mortalidad en la población (*Pardo et al.*, 2018).

Esta resistencia ha evolucionado especialmente en alimentos, dando apertura a algunas estrategias, las cuales son la impermeabilidad celular, mutaciones en el sitio blanco donde interactúa el antibiótico, bombas de eflujo que eliminan el fármaco de la célula y la inactivación del fármaco por destrucción o modificación de la estructura química (Lavilla Lerma *et al.*, 2013).

También cabe mencionar que existen dos resistencias la natural dada por mutaciones al azar en cepas de una misma especie bacteriana y la adquirida en la que por naturaleza la bacteria es sensible a un fármaco, pero ha sido modificada genéticamente por mutaciones en el proceso de transcripción o traducción, o a su vez ha adquirido genes de otros microorganismos presentes en el medio ambiente por transferencia horizontal, por ejemplo los genes de bacterias alimentarias pueden transferirse a bacterias que se encuentran en el hábitat del ser humano. La transferencia horizontal puede darse entre cepas de una misma especie o de diferentes especies ((Godziszewska *et al.*, 2018); (Pérez & Contreras, 2013)).

La Agencia Europea de Alimentos (EMA) ha optado por exponer una recategorización del uso de los antimicrobianos en cuatro categorías, A (evitar el uso de antimicrobianos no autorizados en veterinaria, como la fosfomicina) B (restringir el uso, ya que pueden ocasionar problemas en la salud pública), C (precaución en el uso de antimicrobianos que presenten resistencia), D (prudencia, por lo que es mejor optar por antimicrobianos alternativos en humanos y veterinaria) ((Díaz-Jiménez *et al.*, 2020); (EMA, 2019)); este es solo una de las alternativas que ya se ha tomado en cuenta para tratar de limitar y disminuir la prevalencia de infecciones resistentes a antimicrobianos.

En países Latinoamericanos fueron detectadas algunas bacterias resistentes a antibióticos en el año 2003 en Brasil, por lo que se catalogó como el primer país en detectar un caso de bacterias resistentes, después en Argentina y Colombia en el 2005. En Ecuador según el MSP Ecuador, (2018), en el año 2010 se habla ya de la resistencia que ha surgido como consecuencia de mecanismos de defensa ante antimicrobianos, lo que provoca una disminución en los tratamientos terapéuticos y aumenta la estancia en hospitales. En ese año se detectó la presencia de *Klebsiella pneumoniae*, por lo que desde esa fecha se evaluaron en el año 2014, 2015, 2016 y 2017 bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El más frecuente en casos clínicos según estudios es *Escherichia coli* con

más del 50% presente en la población y en menor incidencia *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* y *Serratia marcescens*. Todos estos han sido identificados por pruebas microbiológicas habituales y amplificación de genes de resistencia (arma, rmtB, VIM, NDM entre otros) presentes en bacterias causantes de enfermedades (Gopalakrishnan *et al.*, 2018).

Frente a la situación de la presencia de bacterias resistentes en varias partes del mundo se planteó el Plan de acción Global contra la resistencia a los antimicrobianos decretado en el año 2015, en el que se pone en manifiesto algunos objetivos a tomar en cuenta, el primero concientizar a la población y comprender el criterio de resistencia, reforzar conocimientos, invertir en nuevas investigaciones para la creación de medicamentos con beneficios para la salud (OMS, 2015). A partir de este plan también se elaboró en Ecuador El Plan Nacional para la prevención y control de RAM (2019-2023) para controlar problemas de resistencia a antimicrobianos.

En los diferentes estudios a nivel mundial se han identificado algunos microorganismos aerobios y anaerobios resistentes presentes en alimentos; como son la *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Citrobacter*, *Eterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* en muestras de carne de pollo, vacuno y cerdo (Ruiz *et al.*, 2018). En la investigación de Titouche *et al.*, (2020), se encontró *Stephylococcus aureus* en productos cárnicos, lácticos y bocadillos y en el trabajo de Godziszewska *et al.*, (2018), *Escherichia coli* en leche de vaca.

Para el estudio de bacterias con resistencia se tienen dos métodos convencionales, el primero son las pruebas microbiológicas, que consisten en pruebas de susceptibilidad de difusión en disco, la realización de alícuotas para el recuento en placa y la prueba en caldo de microdilución del Sistema Nacional (NARMS) (Ramirez-Hernandez *et al.*, 2019). El segundo método convencional es el molecular, con el que se logra la identificación de las bacterias que no ceden a los antibióticos en una infección clínica (Ahmed, 2019) y también se encuentra aquí la búsqueda de genes de resistencia (arma, rmtB, VIM, NDM) (Gopalakrishnan *et al.*, 2018).

Las pruebas de susceptibilidad de difusión en disco con medio agar Mueller-Hinton consisten en inicialmente tomar colonias en solución salina hasta obtener una turbidez de 0,5 McFarland para transferir al medio con los discos de antibióticos y evaluar la zona de inhibición de crecimiento ((Amare *et al.*, 2019); (Huynh *et al.*, 2020)).

Otra técnica bastante empleada es la realización de alícuotas con la muestra (1:10) para el recuento en placa con medio sólido Agar Plate Count (APC) y la prueba en caldo de microdilución en placas de 96 pocillos (Ramirez-Hernandez *et al.*, 2019).

Por otro lado, también se encuentra la identificación de bacterias resistentes en las muestras con la amplificación de la región 16S RNAr (Ahmed, 2019) y la verificación de si estas bacterias presentan genes de resistencia mediante el aislamiento, amplificación y secuenciación de los diferentes genes de resistencia (*arma*, *rmtB*, *VIM*, *NDM*) (Gopalakrishnan *et al.*, 2018).

Todas estas pruebas no permiten trabajar con comunidades bacterianas de crecimiento rápido y tampoco simular una infección bacteriana en el cuerpo humano, ya que por ejemplo en la difusión en disco primero el antibiótico en estudio debe difundirse a través del agar para actuar sobre las bacterias y no como en el cuerpo que se difunde por medio de la sangre. Las pruebas genotípicas en cambio, no dan información de todos los determinantes de resistencia y las fenotípicas o microbiológicas requieren un número relativamente grande de microorganismos y son lentas. Además, hay que destacar que bacterias con altas tasas de crecimiento pueden ser las causantes de la dispersión rápida de la infección, llegando a no poder tratarla a tiempo. Debido a este inconveniente una detección rápida de todas las bacterias presentes en la muestra podrían ayudar a tener un mejor control del paciente y de la propagación de un individuo a otro (Burnham *et al.*, 2017).

Este problema es de relevancia a nivel mundial por la incontrolable diseminación de patógenos resistentes de un país a otro, que afecta no solo a la salud pública mundial que cada vez tiene un retroceso de la medicina moderna, sino también a nivel económico de cada país, por el aumento de los costos en la atención de salud y seguridad sanitaria ((Pardo *et al.*, 2018); (Calderón & Aguilar, 2016); (Martínez-Martínez, 2016)).

En vista de que las pruebas actuales de aislamiento e identificación de microorganismos resistentes no permiten detectar bacterias con altas tasas de crecimiento y tampoco determinar la resistencia de una comunidad microbiana a varios antimicrobianos, en este estudio se pretende evaluar un quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de bacterias anaerobias susceptibles a antibióticos.

El quimiostato simple de una etapa, se caracteriza por ser un biorreactor selectivo, que opera en modalidad continua y que ha sido utilizado como herramienta de selección de microorganismos. Básicamente es un fermentador de tanque agitado con velocidad constante, donde no varía el volumen del fermentador y se puede controlar varios parámetros ambientales que no se logran controlar en un cultivo por lotes. Adicionalmente, el quimiostato permite elegir la velocidad específica de crecimiento (a través de la manipulación de la tasa de dilución (D) a la cual crecerán los microorganismos y mantener un crecimiento constante indefinido. La agitación constante permite tener una homogeneidad, es decir la composición que se encuentra dentro del fermentador es la misma que sale constantemente (Acevedo *et al.*, 2002). Las características del quimiostato hacen factible el aislamiento de bacterias con crecimiento rápido, es económico, fácil de replicarlo en cualquier laboratorio, por lo que se puede emplear en unidades de salud, laboratorios clínicos, academia, industria de alimentos, agricultura, ganadería, camales municipales y fuentes de agua y suelo para poder detectar comunidades bacterianas posiblemente multiresistentes ((Burnham *et al.*, 2017); (Acevedo *et al.*, 2002)). Por lo antes mencionado, en la presente investigación se planteó la siguiente hipótesis: El sistema tecnológico (quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos) permitirá detectar bacterias anaerobias multiresistentes a antibióticos y que presenten altas velocidades específicas de crecimiento.

Como objetivo general: Determinar 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 anaerobias multiresistentes a antibióticos y que presentan altas velocidades específicas de crecimiento en fuentes alimenticias y como objetivos específicos: Establecer un sistema tecnológico (quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos), analizar la capacidad del sistema tecnológico utilizado para la detección de comunidades bacterias anaerobias multiresistentes 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 las comunidades bacterianas anaerobias multiresistentes a antibióticos que se establecen en el quimiostato.

4. Materiales y Métodos

4.1 Descripción del sitio de muestreo

De todos los mercados del Distrito Metropolitano de Quito, se tomó en cuenta uno al Centro-Sur de la ciudad, por la mayor acogida de los clientes. De este lugar mediante observación se determinó los puestos de venta que tenían más riesgo de contaminación por la mala manipulación y el desaseo del lugar.

4.2 Muestras de alimentos del mercado de Quito

Las muestras tomadas para el estudio fueron: Carnes crudas (carne de res y pollo), leche, queso y comidas elaboradas (cevichochos, salchipapas y mote con fritada). Estas muestras fueron recolectadas mediante la compra de las mismas a los vendedores de los puestos del mercado y llevadas al laboratorio.

4.3 Elaboración del medio de cultivo

El medio de cultivo para los microorganismos fue elaborado según las recomendaciones de Acevedo *et al.*, (2002), utilizando la siguiente ecuación (1) para el cálculo de los nutrientes:

$$S_0 = SF + \frac{XF - X_0}{\frac{Y_x}{s}} \quad (1)$$

S₀: Concentración inicial del nutriente

SF: Concentración final del nutriente

XF: Concentración final de los microorganismos

X₀: Concentración inicial de los microorganismos en el cultivo antes de que empiece a operar

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

Los nutrientes y sus cantidades necesarias para el medio de cultivo utilizado para la aclimatación, alimentación del quimiostato y el sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos se pueden observar en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Composición del medio de cultivo

Medio de cultivo (1L)	
Componentes	Concentración
Fuente de carbono: Sacarosa	32,13 g/l
Fuente de nitrógeno: Extracto de quinoa	0,42 g/l / 600 ul
Buffer fosfato: KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
K ₂ HPO ₄	0,9 g/l

pH 7

Nota: Para la preparación del extracto de quinoa pesar 21,25 g de grano de quinoa, hervir en 30 ml, licuar y tamizar. Tomado de Acevedo *et al.*, (2002).

Elaborado por: (La autora, 2021).

4.4 Periodo de aclimatación

Para el periodo de aclimatación se emplearon matraces erlenmeyer de 100 mL y en cada uno se colocó un 10% de inóculo (10 ml), el mismo que fue obtenido mediante un licuado total de todas las muestras recolectadas y el resto se completó con medio hasta el tope de volumen del erlemeyer, para desplazar todo el flujo de aire del matraz. Esta fase permitió el desarrollo de la comunidad bacteriana presente en los alimentos, para posteriormente poder aislarla e identificar la presencia de multiresistencia a antibióticos.

Los parámetros ambientales tomados en cuenta fueron: incubación a 30°C por 72 horas, sin agitación y para permitir la salida de gases de fermentación y neutralizar bioaerosoles se conectó una manguera en la tapa del erlemeyer que conectaba con un matraz que contenía una solución saturada de sulfato de cobre.

4.5 Montaje, puesta en marcha y operación del sistema tecnológico: quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos

El quimiostato fue construido con materiales del laboratorio, como son matraces de 500 ml que tenían una oliva a un costado, en donde se conectó una manguera que permita la salida del caldo de cultivo (residuos). En las tapas de los matraces se colocaron dos olivas una para la salida de gases producidos por el ensayo hacia una solución saturada de Sulfato de cobre y la otra para el ingreso constante de flujo (medio de cultivo) a partir de botellas plásticas de 1 galón **Figura 1 Montaje y operación del quimiostato simple de una etapa, del sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y análisis molecular**

Una vez construido el quimiostato, se procedió a su montaje en una plancha de calor a 30°C, con agitación a 150 rpm y se puso en marcha primero como un cultivo por lotes, es decir, sin entrada y salida de fluidos, con 450 ml de medio de cultivo y 50 ml de inóculo proveniente del periodo de aclimatación, hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial. Una vez que se alcanzó la fase de crecimiento exponencial se empezó con el ingreso y la salida de flujo continuo, de esta forma se operó el quimiostato a diferentes tasas de dilución (0,042; 0,4; 0,6 h⁻¹).

El flujo de entrada del medio de cultivo se calculó utilizando la siguiente ecuación (2):

$$\text{Flujo de entrada (l * h}^{-1}\text{)} = D \text{ (tasa de dilución)h}^{-1} * \text{Volumen del líquido dentro del quimiostato (l)} \text{ (2)}$$

En cada tasa de dilución se esperó al menos tres tiempos de residencia (τ) para que el cultivo bacteriano de los quimiostatos llegue a estado estacionario. El tiempo de residencia se calculó mediante la siguiente ecuación (3):

$$\tau \text{ (tiempo de residencia)h} = \frac{\text{Volumen del líquido en el quimiostato (l)}}{\text{Flujo de entrada (l * h}^{-1}\text{)}} \quad (3)$$

Para la detección de bacterias no susceptibles a antibióticos, se llevó a cabo el estudio en tubos de ensayo **Figura 1 Montaje y operación del quimiostato simple de una etapa, del sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y análisis molecular**

, donde se colocó el medio de cultivo mencionado en la **Tabla 1**, el inóculo tomado de los quimiostatos en las diferentes tasas de dilución y las diferentes dosis de cada antibiótico para 24 horas. Las dosis para el ensayo fueron tomadas según como se indica en el Vademécum para 24 horas, por ejemplo se puede observar el cálculo en el **Anexo 1**. Las cantidades necesarias para este ensayo se pueden visualizar en la **Figura 1 Montaje y operación del quimiostato simple de una etapa, del sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y análisis molecular**

Nota: 1. Salida de caldo de cultivo con las células que no se adaptan a la tasa de dilución 2. Salida de gases 3. Ingreso de medio de cultivo 4. Sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y 5. Identificación molecular de las comunidades bacterianas.
Fuente: (La autora, 2022).

Tabla 2.

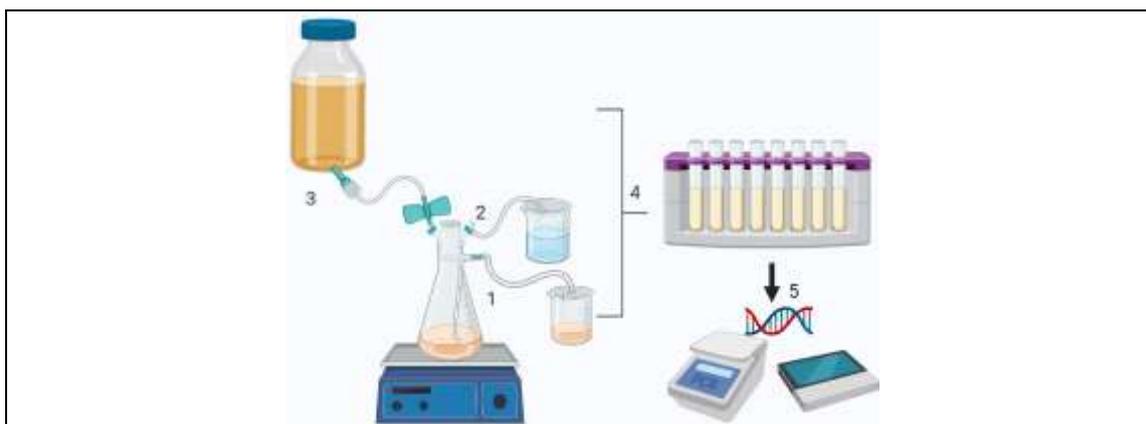


Figura 1 Montaje y operación del quimiostato simple de una etapa, del sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y análisis molecular

Nota: 1. Salida de caldo de cultivo con las células que no se adaptan a la tasa de dilución 2. Salida de gases 3. Ingreso de medio de cultivo 4. Sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y 5. Identificación molecular de las comunidades bacterianas.

Fuente: (La autora, 2022).

Tabla 2

Ensayo de detección de susceptibilidad a antibióticos en comunidades bacterianas

Antibiótico	Clase	Dosis (ug/ml)	Medio de cultivo (uL)	Inóculo (uL)
Amoxicilina	Betalactámico	3125	5997,39	600
Gentamicina	Aminoglucósido	500	5397	600
Amikacina	Aminoglucósido	2500	5391	600
Ceftriaxona	Cefalosporina	3333,3	5394	600
Ampicilina	Betalactámico	666666,7	5393	600
Control	-	-	5400	600

Nota: Los antibióticos fueron de uso inyectable. Al tubo control en lugar de antibiótico se le colocó agua. Información tomada de MSP Ecuador, (2018) y del Vademécum (Rodríguez, 2013).

Elaborado por: (La autora, 2022).

Estos tubos fueron incubados por 24 horas, a 36°C y se evaluó el crecimiento celular mediante la determinación de la densidad óptica en el espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda antes y después del tiempo de incubación (Tonoyan *et al.*, 2019).

Con la densidad óptica se calculó la razón OD con la ecuación (4) para establecer primero si hay algún cambio en el crecimiento bacteriano antes y después de incubar la muestra y la segunda razón con la ecuación (5), para interpretar los resultados y saber si hay susceptibilidad o no al antibiótico por parte de la comunidad bacteriana del quimiostato en base al control de estudio.

$$\text{Razón OD} = \frac{\text{OD después de incubar}}{\text{OD antes de incubar}} \quad (4) \quad \text{Índice de susceptibilidad} = \frac{\text{Razón OD de cada antibiótico}}{\text{Razón OD del control}} \quad (5)$$

Para determinar si la comunidad bacteriana fue o no susceptible a los antibióticos, se tomó como escala de interpretación la siguiente: si el índice de susceptibilidad es mayor o igual a 1 no es susceptible a los antibióticos y si es menor a 1 es susceptible a los antibióticos.

Esta metodología de detección de susceptibilidad a antibióticos es nueva y tiene ciertas ventajas frente al antibiograma, como son que el medio líquido permite que el antibiótico llegue más rápido a las células y a su vez permite un análisis de comunidades bacterianas y no solo de un cultivo puro.

4.6 Conservación de comunidades bacterias aisladas

La conservación de comunidades bacterianas del quimiostato se llevó a cabo en tubos eppendorf con glicerol. Esta conservación consistió en mezclar 200 ul de glicerol y 800 ul de caldo de cultivo con las comunidades bacterianas de las diferentes tasas de dilución. Estos tubos fueron congelados a -4° C para el posterior estudio molecular.

4.7 Pruebas moleculares

Las pruebas moleculares se realizaron para identificar las bacterias que formaron parte de las comunidades bacterianas en el quimiostato que resultaron no susceptibles a los diferentes antibióticos. De todas las muestras se seleccionó aquellas que presentaron valores altos de índice de susceptibilidad en la tasa de dilución de $0,6 h^{-1}$.

Con estas muestras se procedió a realizar la extracción de ADN, la amplificación de la región 16S rRNA mediante PCR convencional y la posterior secuenciación.

4.7.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las comunidades bacterias tomadas de cada tubo con antibióticos, se siguió el protocolo del Kit Column-Pure Bacteria Genomic DNA Isolation (Applied Biological Materials Inc, 2019) (**Anexo 2**).

4.7.2 Cuantificación de ADN

Con el producto de la extracción de ADN se determinó la concentración de ADN en cada muestra en $ng/\mu L$, mediante el equipo Qubit, con el Kit QubitTM 1X dsDNA HS Assay (**Anexo 3**).

4.7.3 Amplificación de la región 16S rRNA

Con el ADN genómico extraído se amplificó la región 16S rRNA, por ser la región más fiable y versátil para los análisis filogenéticos bacterianos. Esta tiene una longitud de aproximadamente 1500 pb, consta de 9 regiones intercaladas conservadas (C1-C9) y nueve variables (V1-V9). De estas regiones, se tomó dos regiones hipervariables (V3 – V4 y V4 -V5), por tener más precisión para el análisis taxonómico (Rajeev *et al.*, 2020).

La Master mix para la región V3 – V4 y V4 – V5 tuvo un volumen final de 25 μl , la cual estaba conformada por los siguientes componentes que se indican en la .

Tabla 3.

Tabla 3

Componentes de la Master mix para la PCR

Componentes	Región V3 – V4	Región V4 – V5
	Volumen (μL)	Volumen (μL)
Buffer	5	5
dNTPs	0,5	0,5
Primer 341F	1	1

Primer 806R	1	1
Templado	3 todas las muestras	1 / Muestras 1 y 2 2 / Muestras 3 y 4
MEGAFI™ DNA Polymerase	0,5	0,5
Agua ultra pura	14	16 / Muestras 1 y 2 15 / Muestras 3 y 4

Nota: El protocolo para la Master mix de la región V3 – V4 fue tomada de Mei *et al.*, (2022) y la de la región V4 – V5 de Wang *et al.*, (2020). La denominación de las muestras se muestra en la Tabla 8.

Elaborado por: (La autora, 2022).

El programa de ciclado para las dos regiones varió en el número de ciclos, temperatura y tiempo, como se puede ver en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Fases de ciclado de la región V3 - V4 y V4 - V5

Fases	Región V3 – V4	Región V4 – V5
Desnaturalización inicial	98°C – 1 min	98°C – 3 min
Ciclos	35	25
Desnaturalización	98°C – 10 seg	98°C – 15 seg
Hibridación	56°C – 30 seg	56°C – 30 seg
Extensión	72°C – 30 seg	72°C – 30 seg
Extensión final	72°C – 5 min	72°C – 5 min

Nota: Las fases para la región V3 – V4 fue tomada de Mei *et al.*, (2022) y para la de la región V4 – V5 de Wang *et al.*, (2020).

Elaborado por: (La autora, 2022).

Se determinó la presencia de amplificación de las muestras mediante la corrida en electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con el ladder de 100 pb de Invitrogen™ Trackit™

4.7.4 Secuenciación Metagenómica por MinION Mk 1C IT

Los productos de PCR se prepararon para la secuenciación por nanoporos, agregando primers con colas que a posterior permitan añadir los códigos de barras. Para ello se realizó una corrida por PCR con las mismas condiciones de la **Tabla 4**

Fases de ciclado de la región V3 - V4 y V4 - V5, modificando únicamente los ciclos a 25 y se corroboró la presencia de las bandas en el gel de agarosa al 1,5%.

4.7.4.1 Preparación de Librerías y Secuenciación

Las bibliotecas se prepararon siguiendo el protocolo de Oxford NANOPORO Technologies, donde primero se realizó una corrida de PCR barcoding amplicons (SQK- LSK109) utilizando 12 códigos de barras para la discriminación de las muestras,

seguido de la purificación con el Kit Pure Link[®] PCR Purification, del pooleado, y la reparación y preparación de extremos para la adhesión de los adaptadores con el Kit NEB Next[®] Companion Module y de la purificación con perlas AMPure XP beads. La ligación de adaptadores AMX se llevó a cabo con el Kit Ligation Sequencing (SQK-LSK109), el cual tiene como objetivo permitir el paso del amplicón por el poro para la correcta secuenciación.

Por último, se prepararon las celdas de flujo con el Kit Flow Cell Priming (**Anexo 4**), y se cargó 75 µl (31 ng/µl) de la biblioteca de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El dispositivo de secuenciación MinION se usó para la secuenciación de las muestras por aproximadamente 6 horas a -180mV y seteada para High accuracy bascalling y quality check mayor a 9.

4.7.4.2 Análisis de Datos de la secuenciación metagenómica

El análisis de las secuencias se realizó en la plataforma EPI2ME, donde se asignó la taxonomía bacteriana a nivel de género taxonómico, según el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con una cobertura y una identidad del 95%, como lo indican estudios de análisis metagenómicos (Kim *et al.*, (2022); Hou *et al.*, (2022); Yin *et al.*, (2022).

4.8 Análisis de los datos del nuevo sistema tecnológico

El estudio de investigación se llevó a cabo con dos réplicas independientes del quimiostato simple de una etapa y dos réplicas independientes por cada antibiótico para el ensayo de detección de susceptibilidad de las comunidades bacterianas. Los datos fueron analizados por estadística descriptiva, obteniendo de esta forma el promedio de las réplicas y la desviación estándar de cada muestra.

5. Resultados

5.1 Ensayo del sistema tecnológico quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema detección de susceptibilidad a antibióticos

Los quimiostatos (sistemas de cultivo continuo) imponen un entorno constante, obligando a las células a crecer a una tasa de crecimiento constante, por lo que permiten simular la evolución bacteriana en el entorno del huésped, esto hace que puedan ser de gran utilidad para estudiar bacterias que crecen a altas velocidades específicas de crecimiento y de ser patógenas estas bacterias podrían tener un impacto potencial negativo para el huésped, por la rapidez con la que podrían multiplicarse. Más aún, si estas bacterias presentan resistencia o multiresistencia a antibióticos, el impacto en la salud de los pacientes infectados sería más grave (Tonoyan *et al.*, 2019).

Por ello en este estudio se evaluó un quimiostato simple de una etapa en diferentes tasas de dilución. La primera fue la tasa de dilución baja de $0,042 h^{-1}$, en la que los resultados muestran que las comunidades bacterianas presentaron no susceptibilidad para la amoxicilina y la ceftriaxona con una razón de índice de susceptibilidad de 1,9 y 2,9 respectivamente, según la escala de susceptibilidad a las 24 horas comparadas con el control, como se puede observar en la **Figura 2 Índice de susceptibilidad de la comunidad bacteriana del quimiostato a una tasa de dilución de $0,042 h^{-1}$**

y la

Tabla 5. Sin embargo, habría que comprobar la no susceptibilidad a la amoxicilina, ya que esta puede haber tenido interferencia en la medición de la densidad óptica por su composición en jarabe, dándole un aspecto grumoso blanquecino.

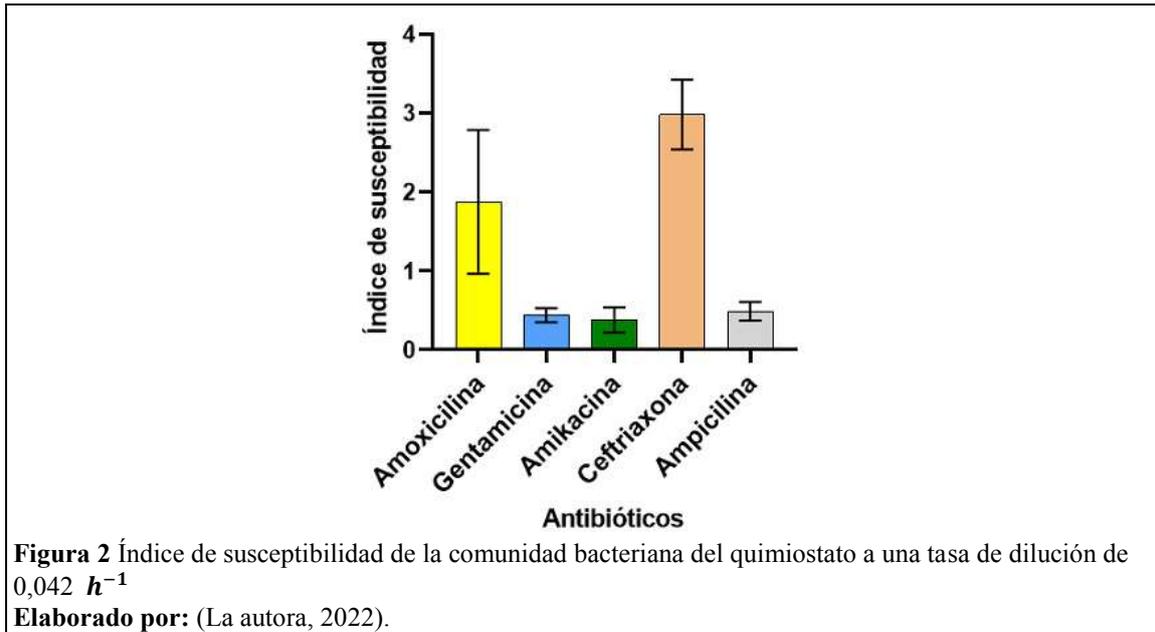


Tabla 5

Interpretación de susceptibilidad a los antibióticos a una tasa de dilución baja de $0,042 \text{ h}^{-1}$

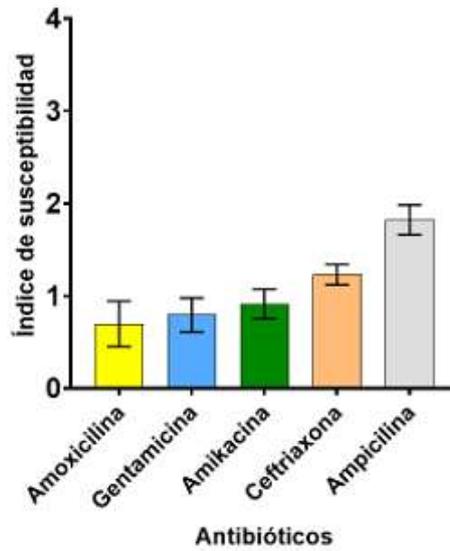
Antibióticos	Índice de susceptibilidad	Interpretación
Amoxicilina	$1,9 \pm 0,9$	*
Gentamicina	$0,4 \pm 0,1$	
Amikacina	$0,4 \pm 0,2$	
Ceftriaxona	$2,9 \pm 0,4$	*
Ampicilina	$0,5 \pm 0,1$	

Nota: susceptible <1 (); no susceptible ≥ 1 (*).

Elaborado por: (La autora, 2022).

La segunda tasa de dilución fue de $0,4 \text{ h}^{-1}$. En esta tasa se muestra que en la ceftriaxona y en la ampicilina existe comunidades bacterianas no susceptibles a estos

antibióticos a las 24 horas comparadas con el control con 1,2 y 1,8 de índice de



susceptibilidad, como se puede ver en la

Figura 3 Índice de susceptibilidad de la comunidad bacteriana del quimiostato a una tasa de dilución de $0,4 h^{-1}$

y la **Tabla 6**.

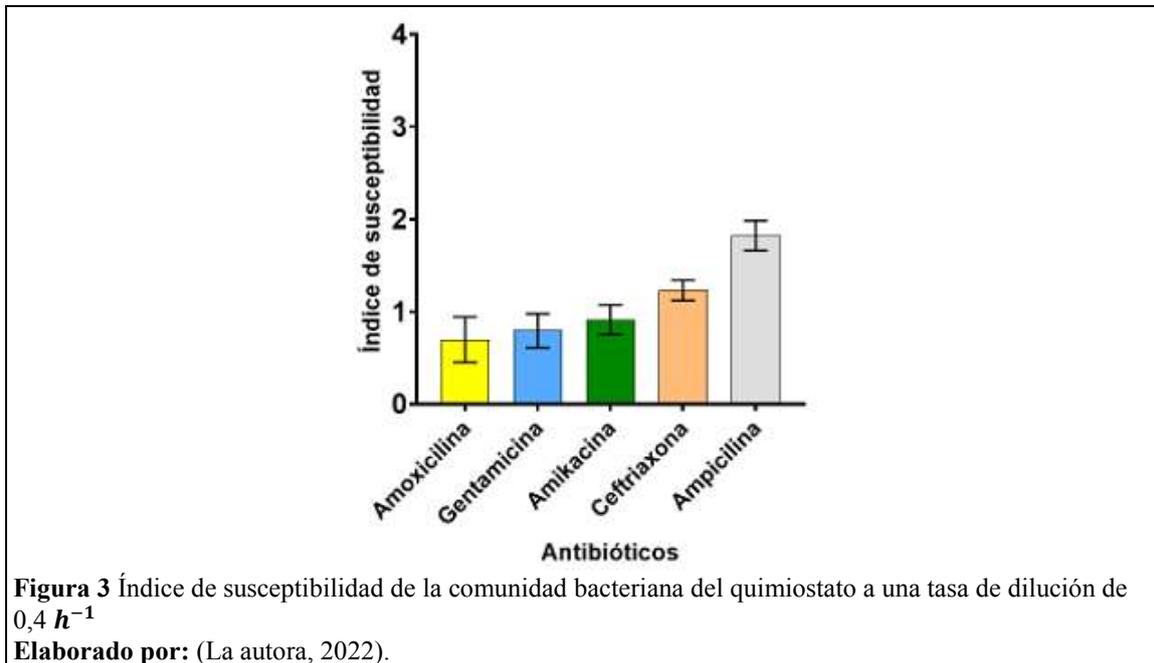


Tabla 6

Interpretación de susceptibilidad a los antibióticos a una tasa de dilución de $0,4 h^{-1}$

Antibióticos	Índice de susceptibilidad	Interpretación
Amoxicilina	0,7±0,2	
Gentamicina	0,8±0,2	

Amikacina	0,9±0,2	
Ceftriaxona	1,2±0,1	*
Ampicilina	1,8±0,2	*

Nota: susceptible <1 (); no susceptible ≥1 (*).

Elaborado por: (La autora, 2022).

En la última tasa de dilución de $0,6 h^{-1}$ del quimiostato, se aisló comunidades bacterianas que lograron adaptarse a un ingreso acelerado de nutrientes; las mismas a las que luego se las expuso a los antibióticos anteriormente señalados, para probar si eran o no susceptibles. La importancia de esta tasa es evaluar si existen comunidades bacterianas que puedan además de crecer rápidamente, ser patogénicas para la salud humana por su resistencia.

Los resultados que se obtuvieron en esta tasa mostraron que la comunidad bacteriana resultó posiblemente no susceptible a la amikacina con 1,2 de índice de susceptibilidad, el cual puede variar por la desviación estándar como se puede corroborar en la **Figura 4** Índice de susceptibilidad de la comunidad bacteriana del quimiostato a una tasa de dilución de $0,6 h^{-1}$

y **Tabla 7**.

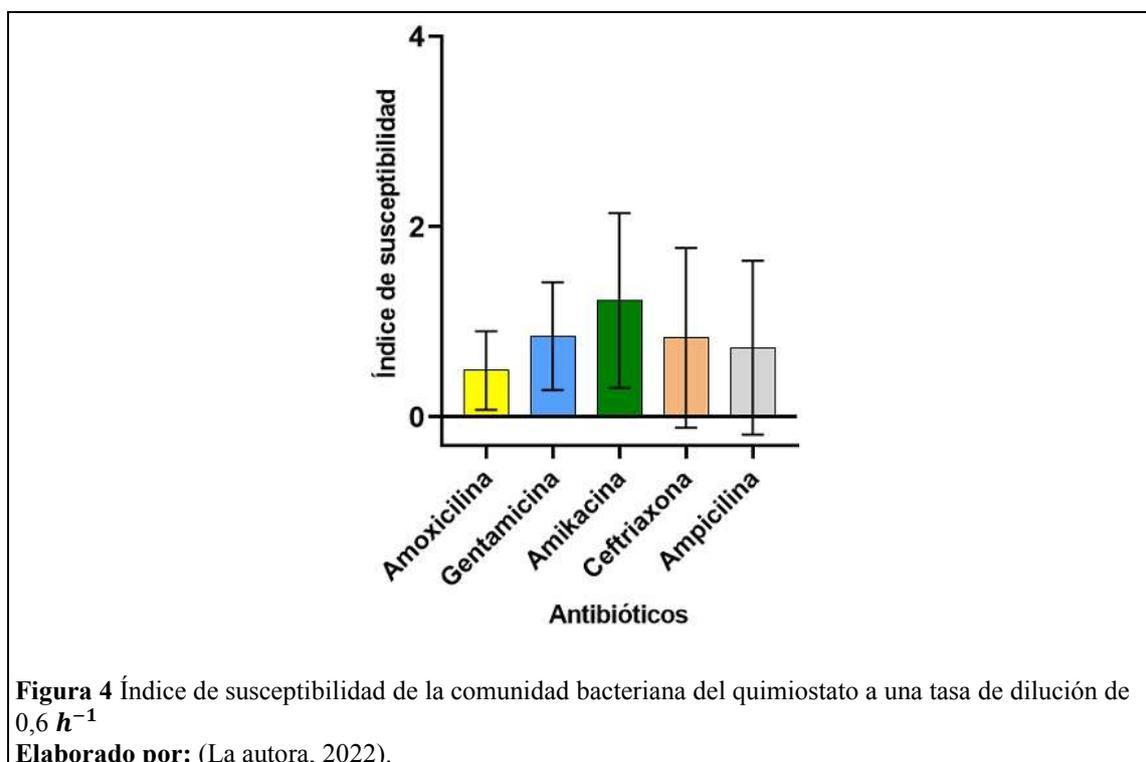


Tabla 7

Interpretación de susceptibilidad de los antibióticos a una tasa de dilución de $0,6 h^{-1}$

Antibióticos	Índice de susceptibilidad	Interpretación
Amoxicilina	0,5±0,4	
Gentamicina	0,9±0,6	
Amikacina	1,2±0,9	*
Ceftriaxona	0,8±0,9	
Ampicilina	0,7±0,9	

Nota: susceptible <1 (); no susceptible ≥1 (*).

Elaborado por: (La autora, 2022).

5.2 Identificación molecular de las comunidades microbianas en el quimiostato no susceptibles a antibióticos

Para el análisis molecular se tomó en cuenta únicamente las muestras de la tasa de dilución de $0,6 h^{-1}$ por ser la tasa en la que las comunidades bacterianas crecieron a una alta velocidad, lo que podría significar una rápida propagación de los microorganismos en los pacientes infectados. De esta tasa, las muestras seleccionadas fueron denominadas, cómo se indica en la **Tabla 8**. Una de ellas es la comunidad bacteriana con posible no susceptibilidad alta a la amikacina, seguida de la comunidad bacteriana no susceptible a la gentamicina con un índice de susceptibilidad medio.

Tabla 8

Muestras seleccionadas para la identificación molecular

Antibióticos	Nombre de la muestras
Gentamicina del Biorreactor 1	Muestra 1
Gentamicina del Biorreactor 2	Muestra 2
Amikacina del Biorreactor 1	Muestra 3
Amikacina del Biorreactor 2	Muestra 4

Elaborado por: (La autora, 2022).

5.3 Amplificación de las regiones hipervariables (V3 – V4 y V4 –V5) de la región 16S rRNA

Con los primers dirigidos a las regiones hipervariables (V3-V4 y V4-V5), se logró amplificar las muestras para la identificación taxonómica. La primera amplificación, se dio para la obtención de un gran número de copias de las regiones hipervariables, seguida de una segunda amplificación con los mismos primers añadidos colas para permitir a posterior el reconocimiento por los códigos de barras.

En la corrida de electroforesis, la región V3-V4 presentó un tamaño de 470 pb en las dos amplificaciones (

Anexo 5 y

Anexo 7) y la región V4-V5 un tamaño de 450 pb (

Anexo 6 y

Anexo 8), como lo menciona el protocolo de Novogene (Advancing Genomics, n.d.) y los trabajos de Mei *et al.*, (2022) y Wang *et al.*, (2020).

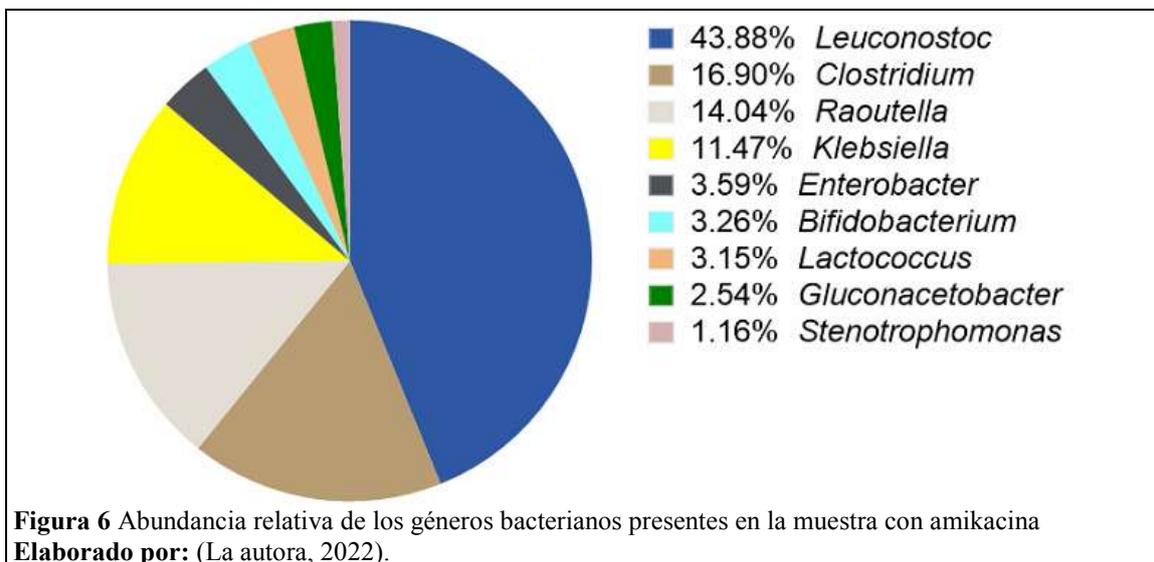
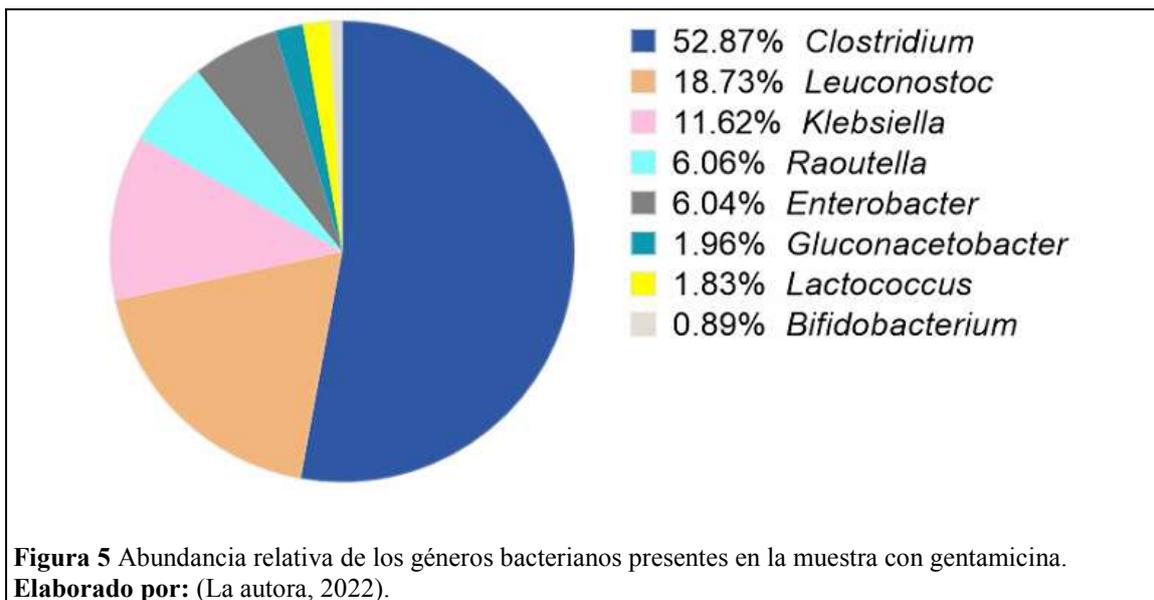
5.4 Secuenciación metagenómica de las muestras

La secuenciación por Nanoporos de las muestras de comunidades bacterianas dio un total de 274.013 lecturas para las comunidades bacterianas expuestas a gentamicina, de éstas el 15% que corresponde a 41.032 fueron clasificadas y el 85% es decir 232.981 no clasificadas con una precisión media del 96%. En cambio para la amikacina se obtuvo un total de 380.052 lecturas, con un 15% que pertenece a 57.123 de lecturas clasificadas y el 85% restante 322.929 no clasificadas con una precisión media del 97%.

Por medio de las lecturas clasificadas por el NCBI se identificaron los géneros bacterianos presentes en cada muestra. En el caso de las comunidades bacterianas de la

gentamicina se identificó 8 géneros de bacterias comunes a los de la amikacina, donde la variación que se tuvo es en la abundancia relativa de estos en las muestras, como se puede ver en la **Figura 5** Abundancia relativa de los géneros bacterianos presentes en la muestra con gentamicina.

para la muestra con crecimiento de la comunidad bacteriana expuesta a gentamicina y en la **Figura 6** Abundancia relativa de los géneros bacterianos presentes en la muestra con amikacina para la expuesta a amikacina.



6. Discusión

La resistencia a antibióticos es un problema global, por lo que para la administración de terapias antimicrobianas en los pacientes, se debe tomar el perfil de susceptibilidad, para optimizar y reducir la terapia. El uso adecuado de antibióticos es importante en el manejo de la resistencia, ya que menor será el riesgo de erosión del beneficio de un fármaco. Igualmente, hay que añadir que para descubrir nuevos antibióticos seguros se requiere una inmensa cantidad de tiempo y recursos, por lo que las pruebas de laboratorio deben apoyar una mejor gestión y preservación de los medicamentos ((Burnham *et al.*, 2017); (Gelbíčov^á *et al.*, 2022)).

En base a los métodos actuales de búsqueda de bacterias con resistencia, se ha visto que tienen varias desventajas; la primera es que requiere de un número grande de organismos viables, por lo implica tiempo, la segunda no puede aproximarse a la compleja ecología de la infección (interacción con otros microorganismos y biodisponibilidad en el tejido) y la tercera que solo se trabaja con microorganismos puros y no con comunidades bacterianas (Tonoyan *et al.*, 2019).

Por lo que con esta investigación se implementará un nuevo método que permite aislar comunidades microbianas no susceptibles a antibióticos. Este método se establece en la utilización de un quimiostato, donde la población bacteriana se puede mantener en estado de crecimiento estacionario y permite alcanzar altas densidades de células en un corto periodo de tiempo. Estas ventajas se dan por el suministro de flujo de medio constante y la eliminación continua de caldo de cultivo con las células muertas (Risager, Petersen, *et al.*, (2020); Risager, Wulff, *et al.*, (2020).

En el estudio se utilizaron diferentes tasas de dilución, dentro de las cuales se dotaron de un ambiente adecuado para el surgimiento de microorganismos que se adapten a las condiciones ejercidas en los quimiostatos. Es decir, que al probar las tres tasas de dilución se dio lugar a una presión selectiva continua que impulsa a la adaptación de las células con ventajas de crecimiento en cada tasa y la eliminación de aquellas que no son capaces de adaptarse (Risager, Petersen, *et al.*, 2020).

La presión selectiva en el quimiostato también implica una variación en el índice de susceptibilidad para cada antibiótico, porque habrán células que no se adaptaron a una tasa de crecimiento y no eran susceptibles a algún antibiótico y otras en cambio a las que el estrés ejercido sobre ellas provoque el surgimiento de no susceptibilidad al antibiótico.

Con lo señalado, se puede deducir que con esta nueva tecnología las células se adaptan al entorno, como lo harían en el organismo de los individuos, originando cambios a nivel de ARN, proteínas por transferencia de genes entre microorganismos y cambios a nivel morfológico. Lo que indica que las bacterias en el organismo del ser humano generan respuestas al estrés celular, como son mutaciones en las proteínas implicadas en las funciones fisiológicas, en el choque térmico, el estrés oxidativo y también cambios en la resistencia (Risager, Petersen, *et al.*, 2020).

En este trabajo de investigación la tasa de dilución de $0,6 h^{-1}$, fue una de las tasas con relevancia en la salud humana, ya que indica que las bacterias son capaces de crecer a altas velocidades en poco tiempo, por lo que resultarían un mayor riesgo para los pacientes de contraer estas infecciones y más aún por estar presentes en los alimentos (Tonoyan *et al.*, 2019).

Los resultados mostraron que los más altos índices de susceptibilidad de las comunidades bacterianas expuestas a agentes antimicrobianos en las tres tasas de dilución, se obtuvieron con la amoxicilina, la ampicilina, la gentamicina, la ceftriaxona y la amikacina. Estos antibióticos fueron seleccionados por ser los más empleados en casos clínicos de infecciones bacterianas, por lo que la presencia de no susceptibilidad hace un llamado a tener una vigilancia más rigurosa en la comercialización de alimentos en los mercados y un mejor cuidado en la administración de estos.

La ceftriaxona, uno de los antibióticos estudiados, pertenece a la familia de las cefalosporinas de tercera generación y se seleccionó porque es utilizado para tratar una amplia gama de infecciones gram negativas y gram positivas. La Organización Mundial de la Salud, la cataloga de importancia crítica para la salud humana, por lo que debe monitorearse constantemente su resistencia, ya que puede transferirse los genes que codifican ESBL entre las diferentes poblaciones bacterianas. Las ESBL, tienen como función hidrolizar las cefalosporina y se propagan entre varios géneros clínicos como son *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* (Rao *et al.*, 2021).

La gentamicina y la amikacina en cambio se han eligió por ser los antibióticos más utilizados para tratar infecciones bacterianas graves gram negativas y algunas gram positivas, pertenecen a la clase de los aminoglucósidos. El mecanismo de acción de estos antibióticos es a través de la interacción con el ARN ribosomal 16S de la

subunidad 30S, por lo que inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas, es decir interrumpen la síntesis de la pared celular bacteriana produciendo así la muerte celular (Santos *et al.*, 2021).

La resistencia a estos antibióticos está dada por mecanismos que implican la inactivación del antibiótico por modificaciones enzimáticas, sistemas de bombas de expulsión y cambios en la pared celular bacteriana (Santos *et al.*, 2021). En investigaciones se ha encontrado bacterias gram negativas que codifican enzimas aminoglucósidos modificados (acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleótido transferasas) adquiridas a través de la integración, la transposición y la conjugación, las que permiten el surgimiento de la resistencia (Yang *et al.*, 2022). En estos estudios se muestra que existe una resistencia del 51,8% para *Escherichia coli* y 76% para *Klebsiella pneumoniae* para la gentamicina y la amikacina (Obakiro *et al.*, 2021).

La amoxicilina un betalactámico, con presentación comercial en pastillas y jarabes empleado para infecciones por gram negativas, como por gram positivas en niños y adultos ha presentado ya en trabajos de investigación una disminución de su efectividad por la presencia de mutaciones que no permiten la unión del fármaco a las proteínas de unión en las bacterias. Una de las mutaciones más reconocidas es en el gen PBP 1A (Huttner *et al.*, 2020).

Por otro lado la ampicilina, un antibiótico betalactámico de amplio espectro, es utilizada en la agricultura, la medicina veterinaria, medicina humana y en la industria alimentaria (M. Yin *et al.*, 2022). Por lo tanto el abuso de este antibiótico ha provocado la presencia de problemas de resistencia, como lo reporta el estudio de Q. Wang *et al.*, (2021), donde se manifiesta la existencia de bacterias patógenas oportunistas con genes de resistencia a betalactámicos.

Con lo mencionado sobre cada antibiótico se verifica que la comunidad bacteriana resultó no susceptible para los antibióticos que ya han venido siendo causantes de problemas de infecciones bacterianas graves por su perfil de resistencia. Además, se observa que en las tres tasas de dilución puede haber una posible multiresistencia a antibióticos, ya que no sólo se ve no susceptibilidad a uno solo sino a más antibióticos. Esta incidencia se puede corroborar con el estudio de Arana *et al.*, (2017) en donde se

ve bacterias que presentan resistencia a varios antibióticos como a los betalactámicos y a los aminoglucósidos.

Lo más alarmante es que en la tasa de $0,6 h^{-1}$, los antibióticos más preocupantes son los pertenecientes a los aminoglucósidos. Estos antibióticos aminoglucósidos son de amplio espectro y tienen propiedades químicas y farmacocinéticas favorables, por lo que han sido bastante utilizados como una opción valiosa e inevitable frente a otros antibióticos que presentan resistencia (Maxwell *et al.*, 2021). Al presentar estos antibióticos una posible resistencia se vuelven un problema mundial para tratar infecciones graves que son causantes de altas mortalidades en la población y más aún porque las comunidades bacterianas no susceptibles a estos fármacos se encuentran en los alimentos de los mercados que consumen diariamente las personas.

Con la identificación molecular de los géneros bacterianos que integran las comunidades bacterianas anaerobias no susceptibles a antibióticos de la tasa de dilución de $0,6 h^{-1}$ se pudo corroborar si estas comunidades bacterianas aisladas con el quimiostato son patógenas y si tienen antecedentes de resistencia.

Uno de ellos y el primero en la gentamicina fue el *Clostridium*. En este género se incluyen bacterias anaerobias, gram positivas, formadoras de esporas pertenecientes al filo *Firmicutes*, prosperan en entornos de suelo y en el intestino humano y animal. Algunos son patógenos asociados con enfermedades humanas y animales, como son el tétanos, el botulismo, la gangrena gaseosa y la colitis pseudomembranosa (Pahalagedara *et al.*, 2020). Dos especies de este grupo son transmitidos por alimentos como son el *Clostridium botulinum* y el *Clostridium perfringens*. Esto concuerda con este estudio, ya que las muestras son provenientes de alimentos y comidas elaboradas de los mercados.

Asimismo, existen estudios que evidencian la resistencia de especies del género *Clostridium* a los aminoglucósidos, como es el de Hu *et al.*, (2018), el cual habla de un porcentaje de resistencia del 10% para gentamicina y el 7% para amikacina, por parte del *Clostridium perfringens* y Park *et al.*, (2015), en cambio indica un 100% de resistencia para gentamicina en el mismo patógeno.

El segundo género en la gentamicina y primero en la amikacina es el *Leuconostoc*. Este género corresponde al grupo de bacterias del ácido láctico, son cocobacilos gram positivos y anaerobios facultativos lo que comprueba que este género pudo provenir de

la leche o del queso y crecer en abundancia. Generalmente no son patógenos para los seres humanos, pero se ha encontrado ciertas especies causantes de infecciones, en las que la resistencia es variable para los aminoglucósidos (Zikmanis *et al.*, 2020).

El género *Klebsiella*, es el tercero en la gentamicina y el cuarto en la amikacina. Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, son gram negativas inmóviles y anarobias facultativas por lo que cumplen con las condiciones de aislamiento del quimiostato (Profeta *et al.*, 2021).

La inquietud de la presencia de este género *Klebsiella* en las muestras de los alimentos, radica en que se consideran patógenos oportunistas que se encuentran en la boca, la piel y los intestinos, y pueden diseminarse a otros tejidos para causar infecciones potencialmente mortales por su resistencia a antimicrobianos, como se puede ver en el estudio de Soares de Moraes *et al.*, (2022), donde se identificó una resistencia del 51,4% para gentamicina y para amikacina 26,2% y en Balasubramanian *et al.*, (2021), se tiene una alta resistencia a gentamicina de 98,6% y 71,2% a amikacina por parte de *Klebsiella pneumoniae*.

Otro género cuarto en abundancia en la gentamicina y tercero en la amikacina es el *Raoultella* de la familia *Enterobacteriaceae*, es un género nuevo, ya que antes se lo consideraba dentro del género *Klebsiella* (Massé *et al.*, 2020). Se cataloga por ser gram negativo, aerobio y anaerobio facultativo, se localiza en diversas fuentes, como humanos, animales, agua, plantas, suelos, ambientes abióticos y alimentos, lo que confirma la presencia de este género en las muestras secuenciadas (Yabo Liu *et al.*, 2020). Es reconocido como un patógeno humano oportunista no muy común sensible a la mayoría de antibióticos a excepción de la penicilina (Yabo Liu *et al.*, 2020), pero para Yu *et al.*, (2020), estos son multiresistentes a β -lactámicos, aminoglucósidos, sulfalinamida y cloranfenicol.

El quinto género es el *Enterobacter*. Este género es gram negativo, anaerobio facultativo. Reconocido como un importante patógeno oportunista en infecciones nosocomiales (Bonnin *et al.*, 2021). El crecimiento de este género a pesar de los antibióticos confirma lo mencionado por Bonnin *et al.*, (2021), que tiene resistencia intrínseca a varios antimicrobianos y además adquiere elementos genéticos móviles que confieren virulencia y resistencia.

Con menor crecimiento se encuentra el género *Gluconacetobacter*, Este es gram negativo estrictamente aerobio y de ácido acético, por lo que su presencia en las muestras, podría deberse a una transferencia cruzada con los microorganismos del entorno de los demás quimiostatos. Son endófitos de gran potencial agronómico, ya que son promotoras de crecimiento de plantas y tienen efectos beneficiosos para la salud humana, por ende no son patogénicos y no se puede hablar de resistencia a los antibióticos (Dos-Santos *et al.*, (2021); S. S. Kim *et al.*, (2017); (Ying Liu *et al.*, 2020).

Con una abundancia mucho menor se halló el género *Lactococcus*, séptimo en la gentamicina y en la amikacina. Pertenece también a las bacterias de ácido láctico, son gram positivos, anaerobios facultativos (Yerlikaya, 2019). Estas características ratifican la presencia de este género en las muestras. No obstante, según Nunziata *et al.*, (2022), las bacterias ácido lácticas son riesgosas por la resistencia a los antimicrobianos, pueden actuar como reservorios de genes de resistencia a antibióticos, adquiriéndolos o transfiriéndolos a otros microorganismos.

Por otro lado, también se ha encontrado el género *Bifidobacterium*, que a su vez también son ácido lácticas, se definen por bacterias gram positivas, estrictamente anaerobias, pertenece al filo *Actinobacteria* y se encuentra de forma habitual en el tracto gastrointestinal de los seres humanos, animales e insectos, se los utiliza como probióticos en alimentos como el yogurt y el queso (Nunziata *et al.*, 2022).

Este género en el estudio se presenta en menor abundancia, lo que indica que tiene un bajo crecimiento en presencia de la gentamicina y la amikacina, de esta forma también mostrando una baja resistencia a los antibióticos, esto se confirma con Georgieva *et al.*, (2015) y Xu *et al.*, (2018), donde mencionan que algunos autores reportan susceptibilidad a los aminoglucósidos, mas no resistencia.

El último género, que solo se encuentra en la amikacina es el *Stenotrophomonas*. Son gram negativas, aerobias, tienen un papel ecológico al igual que el *Gluconacetobacter* de promover el crecimiento de las plantas. Sin embargo, se ha encontrado que también son responsables de infecciones respiratorias en los humanos e infecciones intestinales con resistencia a los aminoglucósidos (Zhang *et al.*, 2020).

En concreto, varias investigaciones mencionan que las bacterias con crecimiento en los antibióticos de la clase aminoglucósidos (gentamicina y amikacina), pueden presentar

resistencia mediadas por enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs), o por alteración del sitio de unión al ribosoma y por disminución de la permeabilidad celular (Sharifzadeh Peyvasti *et al.*, 2020). Por lo que las bacterias secuenciadas podrían tener cualquiera de estas características y podrían incluso transferir genes de resistencia a las bacterias con las que interactuaron en la comunidad microbiana y así mismo lo harían en el organismo de los seres humanos, dificultando el tratamiento clínico.

7. Conclusiones

- El quimiostato simple de una etapa seguido del sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos muestra ser eficaz para detectar comunidades bacterianas anaerobias no susceptibles a antibióticos, ya que en este estudio se logró detectar varias comunidades bacterianas anaerobias con antecedentes de resistencia a antibióticos.
- Los antibióticos con comunidades bacterianas no susceptibles según la escala del índice de susceptibilidad proveniente de las muestras de alimentos en las tres tasas de dilución fueron los aminoglucósidos (gentamicina y amikacina), la ceftriaxona una cefalosporina, la amoxicilina (betaláctamico) y la ampicilina (betalactámico).
- El análisis metagenómico por MinION de las muestras con un alto índice de susceptibilidad a antibióticos mostró que algunos géneros de bacterias son propios de los alimentos funcionando como probióticos y otros géneros si son considerados como posibles patógenos en los seres vivos, por lo que esta situación intranquiliza, ya que los alimentos de los mercados podrían ser causantes de la diseminación de infecciones con riesgo de resistencia a los aminoglucósidos.
- Además, algo importante de recalcar es que en trabajos de investigación se considera que bacterias con función probiótica también presentan resistencia a los antimicrobianos, por lo que podrían actuar como reservorios de genes de resistencia o transferirlos a otras bacterias.

8. Recomendaciones

- Es necesario realizar un análisis más profundo de las especies bacterianas que se

encuentran en las muestras secuenciadas, para tener certeza de su patogenicidad y su resistencia porque muchos de los géneros mostrados en el estudio pueden como no pueden ser patógenos.

- Se sugiere realizar más investigaciones para conocer los genes de resistencia presentes en las comunidades bacterianas aisladas de las muestras no susceptibles a antibióticos.
- Se recomienda identificar las comunidades bacterianas presentes en la muestra control para poder comparar con las comunidades bacterianas no susceptibles a antibióticos detectadas con esta nueva tecnología.
- Es preciso motivar al gobierno para que se realice monitoreos continuos en los mercados del Ecuador para garantizar una mejor inocuidad alimentaria y disminuir la difusión de bacterias resistentes.

9. Referencias

- Acevedo, F., Gentina, J., & Illanes, A. (2002). *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica* (Ediciones). file:///C:/Users/UserPc/Downloads/acevedo-fundamentos-de-ingenieria-bioquimica_compress.pdf
- Advancing Genomics, I. L. (n.d.). *16S/18S/ITS Amplicon Metagenomic Sequencing*. Novogene; Cell Press. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2019.02.003>
- Ahmed, M. (2019). The investigation of molecular characterization of presumptive *Listeria monocytogenes* isolates from a food-processing environment. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *20*(1), 46–50.
- Amare, A., Worku, T., Ashagirie, B., Adugna, M., Getaneh, A., & Dagneu, M. (2019). Bacteriological profile, antimicrobial susceptibility patterns of the isolates among street vended foods and hygienic practice of vendors in Gondar town, Northwest Ethiopia: A cross sectional study. *BMC Microbiology*, *19*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1509-4>
- Applied Biological Materials Inc. (2019). *D511 : Column-Pure Bacteria Genomic DNA Isolation Kit*. 2414. https://www.abmgood.com/pub/media/productdocument/document/D511-Manual_print_v2.pdf
- Arana, D. M., Rubio, M., & Alós, J.-I. (2017). Evolution of antibiotic multiresistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urinary tract infections: A 12-year analysis (2003–2014). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.)*, *35*(5), 293–298. <https://doi.org/10.1016/J.EIMCE.2017.03.020>
- Balasubramanian, B., Benit, N., Agastian, P., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Elbadawi, Y. B., Mubarak, A., Alfadul, M. S., & Aljowaie, R. M. (2021). Carbapenemases producing *Klebsiella pneumoniae* from the pus of hospitalized patients: In-vitro antibiotic properties of *Streptomyces* against multidrug resistant infectious bacteria. *Journal of Infection and Public Health*, *14*(7), 892–897. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2021.05.006>
- Barletta, R., Pérez, L., Castro, G., Pujol, M., Barletta, J., & Dueñas, Y. (2018). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto para la terapeutica actual.

MediSur, 16(2), 322–334.

Bonnin, R. A., Girlich, D., Jousset, A. B., Emerald, C., Creton, E., Gauthier, L., Jové, T., Dortet, L., & Naas, T. (2021). Genomic analysis of VIM-2-producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(3), 106285. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2021.106285>

Burnham, C. A. D., Leeds, J., Nordmann, P., O’Grady, J., & Patel, J. (2017). Diagnosing antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2017, 15(11), 697–703. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.103>

Calderón, G., & Aguilar, L. (2016). Resistencia Antimicrobiana : Microorganismos Más Resistentes Y Antibióticos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII*, 621, 757–763.

Díaz-Jiménez, D., García-Meniño, I., Fernández, J., García, V., & Mora, A. (2020). Chicken and turkey meat: Consumer exposure to multidrug-resistant Enterobacteriaceae including mcr-carriers, uropathogenic *E. coli* and high-risk lineages such as ST131. *International Journal of Food Microbiology*, 331(December 2019), 108750. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108750>

Dos-Santos, C. M., Nascimento, W. B. A., do Nascimento, B. P., Schwab, S., Baldani, J. I., & Vidal, M. S. (2021). Temporal assessment of root and shoot colonization of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) host seedlings by *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain LP343. *Microbiological Research*, 244, 126651. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2020.126651>

EMA. (2019). Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals -Categorisation of antimicrobials. *European Medicines Agency*, 44(February), 1–67.

Gelbíčová, T., Brodíkova, K., & Karpíšková, R. (2022). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Czech retailed ready-to-eat meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 374, 109727. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109727>

- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N., & Karaivanova, E. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29(1), 84–91. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.987450>
- Godziszewska, J., Pogorzelska-Nowicka, E., Brodowska, M., Jagura-Burdzy, G., & Wierzbicka, A. (2018). Detection in raw cow's milk of coliform bacteria - reservoir of antibiotic resistance. *Lwt-Food Science and Technology*, 93(April), 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.019>
- Gopalakrishnan, S., Kamalanathan, A., Rajan, S., Bhagat, V. M., & Showkath, M. (2018). Emergence of armA and rmtB GENES AMONG VIM, NDM, and IMP Metallo- β -Lactamase-producing multidrug-resistant gram-negative pathogens. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 65(1), 107–118. <https://doi.org/10.1556/030.64.2017.027>
- Hou, Q., Wang, Y., Cai, W., Ni, H., Zhao, H., Zhang, Z., Liu, Z., Liu, J., Zhong, J., & Guo, Z. (2022). Metagenomic and physicochemical analyses reveal microbial community and functional differences between three types of low-temperature Daqu. *Food Research International*, 156, 111167. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111167>
- Hu, W. S., Kim, H., & Koo, O. K. (2018). Molecular genotyping, biofilm formation and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolated from meat supplied to school cafeterias in South Korea. *Anaerobe*, 52, 115–121. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2018.06.011>
- Huttner, A., Bielicki, J., Clements, M. N., Frimodt-Møller, N., Muller, A. E., Paccaud, J. P., & Mouton, J. W. (2020). Oral amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(7), 871–879. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.11.028>
- Huynh, B., Passet, V., Rakotondrasoa, A., Diallo, T., Kerleguer, A., Hennart, M., Lauzanne, A. De, Herindrainy, P., Seck, A., Bercion, R., Borand, L., Pardos de la

- Gandara, M., Delarocque, E., Guillemot, D., Vray, M., Garin, B., Collard, J., Rodrigues, C., & Brisse, S. (2020). *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance, genomic diversity and risk factors. *Gut Microbes*, *11*(5), 1287–1299. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1748257>
- Kim, H., Kim, M., Kim, S., Lee, Y. M., & Shin, S. C. (2022). Characterization of antimicrobial resistance genes and virulence factor genes in an Arctic permafrost region revealed by metagenomics. *Environmental Pollution*, *294*, 118634. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118634>
- Kim, S. S., Lee, S. Y., Park, K. J., Park, S. M., An, H. J., Hyun, J. M., & Choi, Y. H. (2017). *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2, bacterial cellulose producing bacterium isolated from citrus fruit juice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *24*(2), 314–319. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2015.09.031>
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2013). Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *International Journal of Food Microbiology*, *161*(2), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.028>
- Le, T. H., Ng, C., Tran, N. H., Chen, H., & Gin, K. Y. H. (2018). Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor systems. *Water Research*, *145*, 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.060>
- Liu, Yabo, Wu, F., Chen, Q., Ying, Y., Jiang, Y., Lu, J., Lin, X., Li, K., Xu, T., Bao, Q., & Ni, L. (2020). Comparative genomics analysis of *Raoultella planticola* S25 isolated from duck in China, with florfenicol resistance. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *68*, 101398. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2019.101398>
- Liu, Ying, Perumalsamy, H., Kang, C. H., Kim, S. H., Hwang, J. S., Koh, S. C., Yi, T. H., & Kim, Y. J. (2020). Intracellular synthesis of gold nanoparticles by *Gluconacetobacter liquefaciens* for delivery of peptide CopA3 and ginsenoside and anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *48*(1), 777–788. <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1748639>

- Martínez-Martínez, L. (2016). Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Revista Médica Valdecilla*, *1*(1), 7–16.
- Massé, J., Dufour, S., & Archambault, M. (2020). Characterization of *Klebsiella* isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *103*(4), 3392–3400. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17324>
- Maxwell, A., Ghate, V., Aranjani, J., & Lewis, S. (2021). Breaking the barriers for the delivery of amikacin: Challenges, strategies, and opportunities. *Life Sciences*, *284*, 119883. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119883>
- Mei, S., Zhao, M., Liu, Y., Zhao, C., Xu, H., Fang, Y., & Zhu, B. (2022). Evaluations and comparisons of microbial diversities in four types of body fluids based on two 16S rRNA gene sequencing methods. *Forensic Science International*, *331*, 111128. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2021.111128>
- MSP Ecuador. (2018). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en ecuador 2014-2018. In *Ministerio de Salud Publica*.
- Núñez, S., Lacal, V., Núñez, J., Serruto, G., Zárata, M., & Verón, M. (2020). Antibiotic Resistance in Community-Acquired Intra-Abdominal Infections: Diabetes Mellitus as a Risk Factor. *Surgical Infections*, *21*(1), 62–68. <https://doi.org/10.1089/sur.2019.032>
- Nunziata, L., Brasca, M., Morandi, S., & Silvetti, T. (2022). Antibiotic resistance in wild and commercial non-enterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria strains of dairy origin: An update. *Food Microbiology*, *104*, 103999. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2022.103999>
- Obakiro, S. B., Kiyimba, K., Paasi, G., Napyo, A., Anthierens, S., Waako, P., Royen, P. Van, Iramiot, J. S., Goossens, H., & Kostyanev, T. (2021). Prevalence of antibiotic-resistant bacteria among patients in two tertiary hospitals in Eastern Uganda. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *25*, 82–86. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2021.02.021>
- OMS. (2015). *Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos*.
- Pahalagedara, A. S. N. W., Flint, S., Palmer, J., Brightwell, G., & Gupta, T. B. (2020).

Antimicrobial production by strictly anaerobic *Clostridium* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(5), 105910.

<https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.105910>

Pardo, P., Sati, H., & Galas, M. (2018). “One health” approach in the actions to address antimicrobial resistance from a Latin American standpoint. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(1), 103–109.

<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3605>

Park, J. Y., Kim, S., Oh, J. Y., Kim, H. R., Jang, I., Lee, H. S., & Kwon, Y. K. (2015). Characterization of *Clostridium perfringens* isolates obtained from 2010 to 2012 from chickens with necrotic enteritis in Korea. *Poultry Science*, 94(6), 1158–1164.

<https://doi.org/10.3382/PS/PEV037>

Pérez, H., & Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4.5(3), 186–191.

Profeta, R., Seyffert, N., Tiwari, S., Viana, M. V. C., Jaiswal, A. K., Caetano, A. C., Bucker, D. H., Tavares de Oliveira, L., Santos, R., Gala-Garcia, A., Kato, R. B., Padilha, F. F., Lima-Verde, I. B., Ghosh, P., Barh, D., Góes-Neto, A., Figueiredo, H. C. P., Soares, S. C., Meyer, R., ... Castro, T. L. P. (2021). Comparative genomics with a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate reveals the panorama of unexplored diversity in Northeast Brazil. *Gene*, 772, 145386.

<https://doi.org/10.1016/J.GENE.2020.145386>

Rajeev, M., Sushmitha, T. J., Toleti, S. R., & Pandian, S. K. (2020). Sediment-associated bacterial community and predictive functionalities are influenced by choice of 16S ribosomal RNA hypervariable region(s): An amplicon-based diversity study. *Genomics*, 112(6), 4968–4979.

<https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2020.09.006>

Ramirez-Hernandez, Bugarel, M., Kumar, S., Thippareddi, H., Brashears, M., & Sanchez, M. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* strains isolated from chicken carcasses and parts collected at different stages during processing. *Journal of Food Protection*, 82(10), 1793–1801. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-056>

- Rao, M., Laidlaw, A., Li, L., Young, K., & Tamber, S. (2021). Isolation of third generation cephalosporin resistant Enterobacteriaceae from retail meats and detection of extended spectrum beta-lactamase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 189, 106314. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2021.106314>
- Risager, N., Petersen, N., & Sonnenschein, N. (2020). Single-Cell Technologies to Understand the Mechanisms of Cellular Adaptation in Chemostats. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.579841>
- Risager, N., Wulff, T., Palmqvist, E. A., Jørgensen, T. R., Workman, C. T., Sonnenschein, N., Rønne, N. P., & Herrgård, M. J. (2020). Fluctuations in glucose availability prevent global proteome changes and physiological transition during prolonged chemostat cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(7), 2074–2088. <https://doi.org/10.1002/bit.27353>
- Rodríguez, R. (2013). Vademécum Académico de Medicamentos . In *Vademécum Académico de medicamentos* (Sexta). Mc Graw Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1552>
- Ruiz, L., Martínez, S., Gomes, C., Palma, N., Riveros, M., Ocampo, K., Durand, D., Ochoa, T., Ruiz, J., & Pons, M. (2018). Presence of multidrug resistant enterobacteriaceae and escherichia coli in meat purchased in traditional markets of lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(3), 425–432. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3737>
- Santos, V. F., Araújo, A. C. J., Freitas, P. R., Silva, A. L. P., Santos, A. L. E., Matias da Rocha, B. A., Silva, R. R. S., Almeida, D. V., Garcia, W., Coutinho, H. D. M., & Teixeira, C. S. (2021). Enhanced antibacterial activity of the gentamicin against multidrug-resistant strains when complexed with *Canavalia ensiformis* lectin. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104639. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104639>
- Sharifzadeh Peyvasti, V., Mohabati Mobarez, A., Shahcheraghi, F., Khoramabadi, N., Razaz Rahmati, N., & Hosseini Doust, R. (2020). High-level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistance genes among

- Enterococcus spp. clinical isolates in Tehran, Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 318–323. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2019.08.008>
- Soares de Moraes, L., Gomes Magalhaes, G. L., Material Soncini, J. G., Pelisson, M., Eches Perugini, M. R., & Vespero, E. C. (2022). High mortality from carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *Microbial Pathogenesis*, 167, 105519. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105519>
- Titouche, Y., Houali, K., Ruiz-Ripa, L., Vingadassalon, N., Nia, Y., Fatihi, A., Cauquil, A., Bouchez, P., Bouhier, L., Torres, C., & Hennekinne, J. A. (2020). Enterotoxin genes and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from food products in Algeria. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 1043–1052. <https://doi.org/10.1111/jam.14665>
- Tonoyan, L., Fleming, G. T. A., Friel, R., & Vincent O'flaherty, &. (2019). Continuous culture of *Escherichia coli*, under selective pressure by a novel antimicrobial complex, does not result in development of resistance. *Nature Scientific Reports*, 2401. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38925-9>
- Wang, Q., Xu, Y., Liu, L., Li, L. Y., Lin, H., Wu, X. Y., Bi, W. J., Wang, L. T., Mao, D. Q., & Luo, Y. (2021). The prevalence of ampicillin-resistant opportunistic pathogenic bacteria undergoing selective stress of heavy metal pollutants in the Xiangjiang River, China. *Environmental Pollution*, 268, 115362. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.115362>
- Wang, Y., Xu, L., Sun, X., Wan, X., Sun, G., Jiang, R., Li, W., Tian, Y., Liu, X., & Kang, X. (2020). Characteristics of the fecal microbiota of high- and low-yield hens and effects of fecal microbiota transplantation on egg production performance. *Research in Veterinary Science*, 129, 164–173. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2020.01.020>
- Xu, F., Wang, J., Guo, Y., Fu, P., Zeng, H., Li, Z., Pei, X., Liu, X., & Wang, S. (2018). Antibiotic resistance, biochemical typing, and PFGE typing of *Bifidobacterium* strains commonly used in probiotic health foods. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 467–477. <https://doi.org/10.1007/S10068-018-0320-6>
- Yang, X., Wang, Y., Li, J., Chen, J., Liu, J., Tian, G., Zhao, H., Piao, D., Fan, Y., &

- Jiang, H. (2022). Genetic characteristics of an amikacin-resistant *Brucella abortus* strain first isolated from *Marmota himalayana*. *Microbial Pathogenesis*, *164*, 105402. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105402>
- Yerlikaya, O. (2019). Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science*, *102*(1), 124–134. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-14983>
- Yin, H., Ting-Leung, T., Yik, R., Sze, C., Kwong, L., Sze, D., Toi, C., Hoi, S., Siu, J., Wing, H., Tak, I., Chong, M., Yiu, J., Ka, A., & Kit, G. (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 Clinical Microbiology*, *60*(1). <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/JCM.01769-21>
- Yin, M., Zhang, L., Chen, Y., Qi, S., Wei, X., Tian, X., Qiu, J., & Xu, D. (2022). Ultra-sensitive electrochemical detection of ampicillin with hollow tubular mesoporous $\text{In}_2\text{O}_3@Au@Apta$ nanofibers as electrode materials. *Materials Chemistry and Physics*, *282*, 125992. <https://doi.org/10.1016/J.MATCHEMPHYS.2022.125992>
- Yu, C., Wei, X., Wang, Z., Liu, L., Liu, Z., Liu, J., Wu, L., Guo, H., & Jin, Z. (2020). Occurrence of two NDM-1-producing *Raoultella ornithinolytica* and *Enterobacter cloacae* in a single patient in China: probable a novel antimicrobial resistance plasmid transfer in vivo by conjugation. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *22*, 835–841. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2020.06.022>
- Yuan, W., Zhang, Y., Riaz, L., Yang, Q., & Du, B. (2021). Multiple antibiotic resistance and DNA methylation in *Enterobacteriaceae* isolates from different environments. *Journal of Hazardous Materials*, *402*(September 2020), 123822. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123822>
- Zhang, X., Shang, B., Li, X., Li, Z., & Tao, S. (2020). Complete genome sequence data of multidrug-resistant *Stenotrophomonas* sp. strain SXG-1. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *22*, 206–209. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2020.03.005>

Zikmanis, P., Brants, K., Kolesovs, S., & Semjonovs, P. (2020). Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the *Leuconostoc* genus. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 36(11). <https://doi.org/10.1007/S11274-020-02937-9>

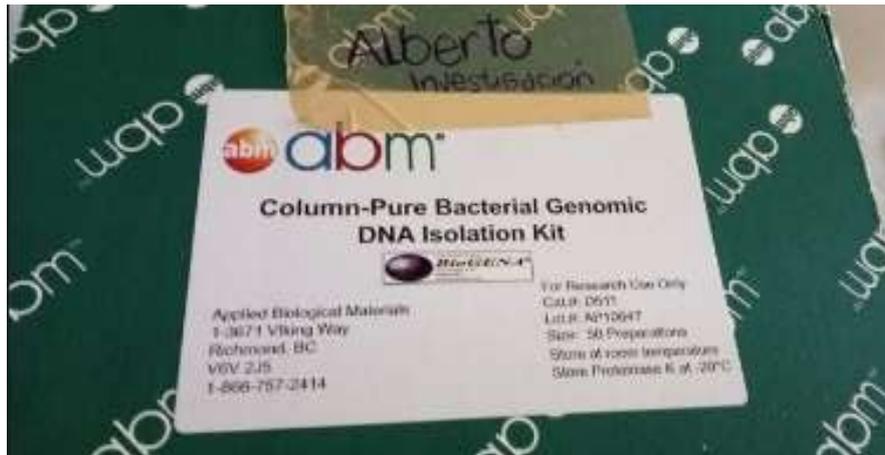
ANEXOS

Anexo 1 Ejemplo de cálculo de las dosis de antibiótico utilizado en el estudio

Gentamicina	Dosis del Vademecum	Dosis para el estudio		
1 Vial - 280 mg en 50 ml	3mg/kg/24 horas	280 mg	50 ml	1 kg=1000 ml
		3 mg	x	tubo = 6 ml = 0,006
		x: 0,536 ml		0,536 * 0,006 = 0,003 ml = 3,21 uL
		3 mg = 3000 ug		
		Dosis = 3000 ug/ 6 ml = 500 ug/ml		

Elaborado por: (La autora, 2022).

Anexo 2 Kit de extracción de ADN



Elaborado por: (La autora, 2022).

Anexo 3 Kit de cuantificación del ADN



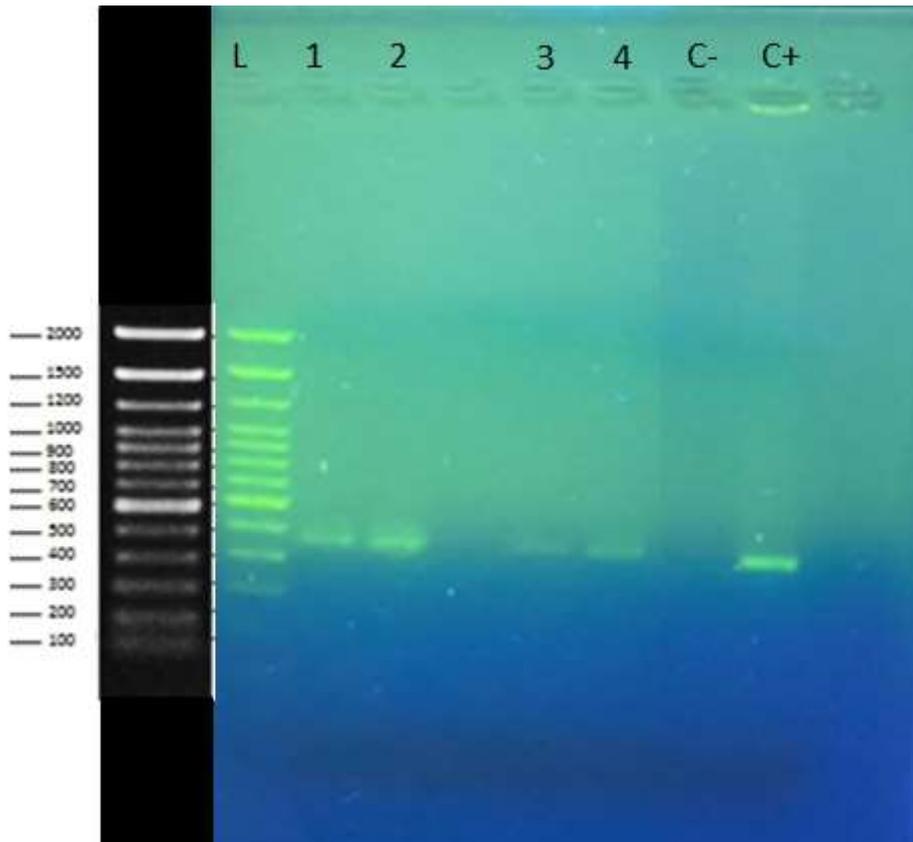
Elaborado por: (La autora, 2022).

Anexo 4 Secuenciador MinION



Elaborado por: (La autora, 2022).

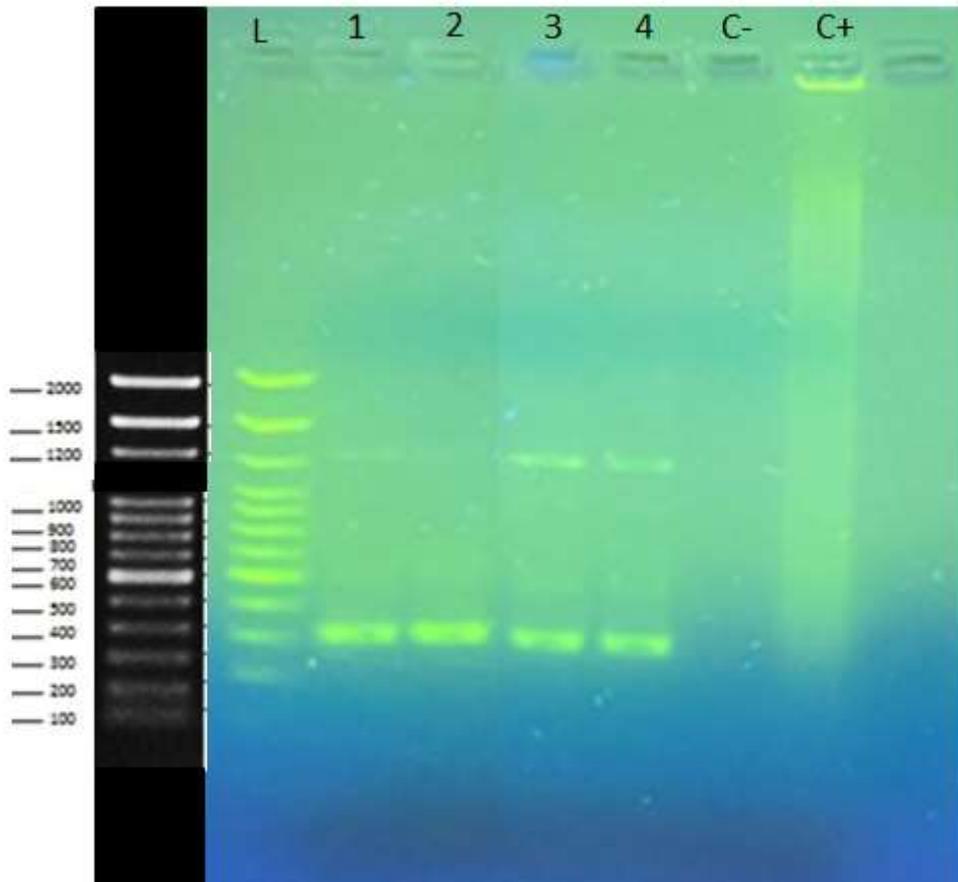
Anexo 5 Amplificación de la región hipervariable V3-V4



Nota: De izquierda a derecha se puede observar el ladder (marcador de peso molecular), Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, Muestra 4, control negativo y control positivo. Las muestras presentan bandas alrededor de las 470 pb.

Elaborado por: (La autora, 2022).

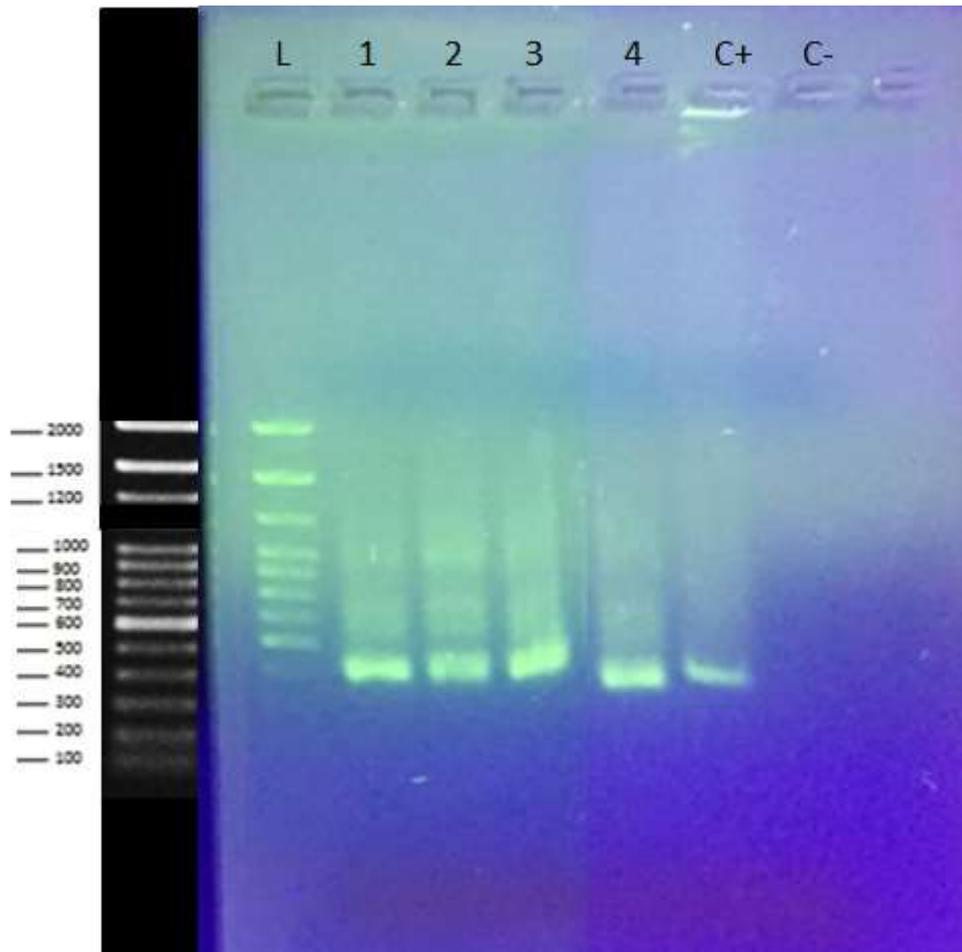
Anexo 6 Amplificación de la región hipervariable V4-V5



Nota: De izquierda a derecha se puede observar el ladder (marcador de peso molecular), Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, Muestra 4, control negativo y control positivo. Las muestras presentan bandas alrededor de las 450 pb.

Elaborado por: (La autora, 2022).

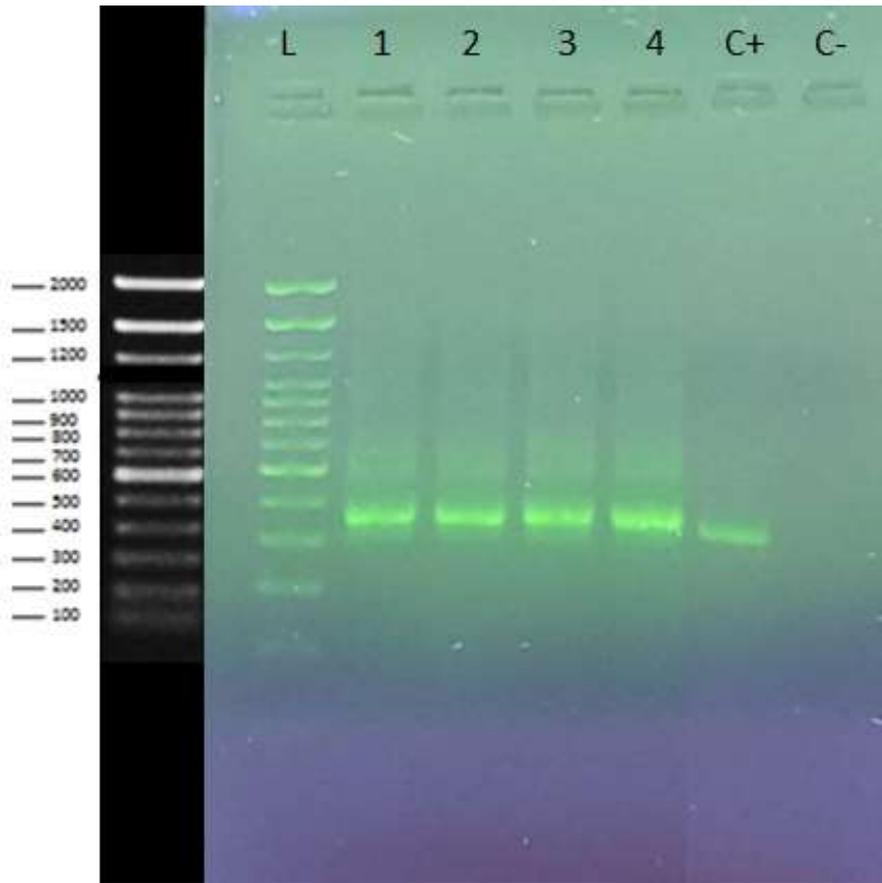
Anexo 7 Amplificación de la región hipervariable V3-V4 de las muestras con cola



Nota: De izquierda a derecha se puede observar el ladder (marcador de peso molecular), Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, Muestra 4, control positivo y control negativo. Las muestras presentan bandas alrededor de las 470 pb.

Elaborado por: (La autora, 2022).

Anexo 8 Amplificación de la región hipervariable V4-V5 de las muestras con cola



Nota: De izquierda a derecha se puede observar el ladder (marcador de peso molecular), Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, Muestra 4, control positivo y control negativo. Las muestras presentan bandas alrededor de las 450 pb.

Elaborado por: (La autora, 2022).