

## Modelado matemático de heterorresistencia en poblaciones bacterianas sometidas a estrés antimicrobiano

Nerea Martínez-López<sup>a</sup>, Adrián Pedreira<sup>a,b</sup>, Carlos Vilas<sup>a</sup>, Míriam R. García<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Group of Biosystem and Bioprocess Engineering (Bio2End). Spanish National Research Council (IIM-CSIC) R/ Eduardo Cabello, 36208, Vigo, España

<sup>b</sup>Group of Recycling and Valorization of Waste Materials (REVAL). Spanish National Research Council (IIM-CSIC) R/ Eduardo Cabello, 36208, Vigo, España

**To cite this article:** Martínez-López, N., Pedreira, A., Vilas, C., García, M.R. 2023. Mathematical modelling of heteroresistance in bacterial populations under antimicrobial stress  
XLIV Jornadas de Automática, 423-428. <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497498609.423>

### Resumen

El rápido avance de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos continúa fomentando la investigación en torno al modelado matemático de los mecanismos que conducen a la emergencia, transmisión y selección de resistencia. El enfoque más extendido para explicar las dinámicas de una población tratada con antimicrobiano consiste en clasificar las bacterias en sensibles y resistentes. Sin embargo, en la realidad existen infinitud de grados de resistencia intermedios en la población, lo que se conoce como heterorresistencia. En este trabajo, se propone un modelo matemático para explicar las dinámicas de una población heterorresistente, introduciendo el grado de resistencia como una variable aleatoria indicadora de la efectividad del antimicrobiano sobre la población. Se analizan las capacidades del modelo y se establecen, además, su observabilidad e identificabilidad estructurales.

*Palabras clave:* Modelado e identificación, Microbiología predictiva, Resistencia bacteriana a antimicrobianos, Heterorresistencia bacteriana, Procesos aleatorios, Observabilidad e identificabilidad estructurales.

### Mathematical modelling of heteroresistance in bacterial populations under antimicrobial stress.

#### Abstract

The rapid development of bacterial antimicrobial resistance still promotes the research on mathematical modelling of the mechanisms leading to the emergence, transmission and selection of resistance. The most common approach to explain the dynamics of an antimicrobial-treated population is to classify bacteria into sensitive and resistant. In reality, however, we can find infinite resistance degrees in the population, known as heteroresistance. In this paper, we propose a mathematical model to explain the dynamics of a heteroresistant population, introducing the resistance degree as a random variable indicating the effectiveness of the antimicrobial. We analyse the model's capabilities and establish its structural observability and identifiability.

*Keywords:* Modeling and identification, Predictive microbiology, Antimicrobial bacterial resistance, Bacterial heteroresistance, Random processes, Structural observability and identifiability.

### 1. Introducción

El problema de la resistencia a los antimicrobianos (AMR, por las siglas en inglés de *Antimicrobial Resistance*) se agrava a un ritmo alarmante, sobrepasando nuestra capacidad para desarrollar nuevos tratamientos. El uso extensivo de compuestos antimicrobianos (antibióticos, pero también desinfectantes o conservantes) durante las últimas décadas, especialmente en

el sector clínico y la industria alimentaria, ha acelerado la aparición de "superbacterias" (Ventola, 2015; Kumar et al., 2020). Tanto es así, que estudios recientes estiman en 1,27 millones los fallecimientos directamente relacionados con AMR tan sólo en el año 2019, mientras que, para 2050, se prevé que esta cifra ascienda a unos 10 millones (Murray et al., 2022), convirtiéndose en una de las principales causas de muerte en todo el mundo.

\*Autor para correspondencia: [miriamr@iim.csic.es](mailto:miriamr@iim.csic.es)

La creciente necesidad mundial de atajar el problema de las “superbacterias” continúa incentivando la investigación en torno al fenómeno de AMR. Sin embargo, todavía carecemos de suficiente información acerca de los mecanismos implicados en la emergencia, transmisión y selección de resistencia en las poblaciones de bacterias. El enfoque teórico, basado en herramientas como el modelado matemático o la simulación numérica, sigue cobrando importancia por su versatilidad y flexibilidad, demostrando su utilidad para apoyar la vía experimental, que demanda más tiempo y recursos. Asimismo, la experimentación es fuente constante de información para el enfoque teórico, generando nuevos conceptos para explicar las observaciones sobre la población real. Este es el caso de la heterorresistencia, una propiedad de origen experimental que describe el fenómeno según el cual una población aparentemente isogénica (es decir, idéntica desde un punto de vista genético) incluye subpoblaciones con distintos grados de AMR a un determinado compuesto antimicrobiano (El-Halfawy and Valvano, 2015).

Aunque la heterorresistencia se observa por primera vez ya en 1947 para poblaciones de bacterias Gram-negativas (Alexander and Leidy, 1947), todavía no hay un estándar bien establecido para definir esta propiedad ni para cuantificarla experimentalmente (El-Halfawy and Valvano, 2015), y sus implicaciones en el desarrollo de AMR continúan sin explorar. Desde el punto de vista clínico, la heterorresistencia plantea un serio obstáculo en el tratamiento de las infecciones bacterianas, dado que las subpoblaciones más sensibles serán eliminadas eficazmente por el antimicrobiano, mientras que las más resistentes pueden prevalecer y repuntar a largo plazo, pudiendo conducir al completo fracaso del tratamiento o a la selección de bacterias farmacorresistentes. El modelado matemático de la heterorresistencia se encuentra todavía en sus primeras fases de desarrollo, probablemente por la falta de medios experimentales para determinar la distribución inicial de AMR en la población. No obstante, se están desarrollando técnicas prometedoras que ya permiten medir heterorresistencia, como la citometría de flujo (El-Halfawy and Valvano, 2015) o modificaciones de los test de susceptibilidad clásicos (Scheler et al., 2020) basados en una única medida cuantitativa de la resistencia; la MIC (por las siglas de *Minimal Inhibitory Concentration*, o la mínima concentración de antimicrobiano que impide el crecimiento apreciable de la población).

La práctica más extendida en el modelado de AMR consiste en clasificar la población en dos estados opuestos; sensibilidad (el antimicrobiano ejerce el máximo efecto inhibitorio) y resistencia (el antimicrobiano no tiene efecto alguno). Estos modelos incluyen además mecanismos biológicos con distintos grados de complejidad, como competencia entre bacterias (Fujikawa et al., 2014) o transferencia horizontal de AMR (Hernández-Beltrán et al., 2021; Zhong et al., 2010), por ejemplo, así como alguna variable o parámetro de naturaleza estocástica (Mena et al., 2020; Gothwal and Thatikonda, 2020). Sin embargo, aunque esta simplificación de la distribución real de resistencia resulta bastante flexible y eficiente en gran variedad de aplicaciones, el ignorar la heterorresistencia inherente a la población puede conducir a graves desviaciones entre el comportamiento real y la predicción arrojada por el modelo. De esta forma, existe una necesidad incipiente de modelos matemáticos que incluyan heterorresistencia y permitan aprovechar toda la información experimental disponible.

Se pueden encontrar pocos trabajos hasta la fecha que versen del modelado matemático considerando heterorresistencia bacteriana. En Djidjou-Demasse et al. (2021), los autores introducen una nueva variable explicativa de la población; el nivel (o grado) de AMR, de manera que las propiedades características se distribuyen en función del grado de resistencia. Sin embargo, el modelo dado en Djidjou-Demasse et al. (2021) emplea ecuaciones integro-diferenciales y puede resultar complejo de analizar e inadecuado para ciertos propósitos. Además, no se explota la aleatoriedad inherente al modelo (y habitual en cualquier proceso biológico), de manera que la población no muestre dos veces la misma respuesta al tratamiento. Por otra parte, Nikolaou and Tam (2006) identifican heterorresistencia con el ratio de muerte celular inducido por el antimicrobiano, tratado como una variable aleatoria (v.a.) que se distribuye de manera discreta en la población. Dicho modelo es conceptualmente más sencillo que el propuesto en Djidjou-Demasse et al. (2021), pero supone que las subpoblaciones con distintos grados de resistencia evolucionan de manera desacoplada, desechando la posibilidad de que las bacterias aumenten o reduzcan su grado de AMR a través de modificaciones genotípicas y/o fenotípicas.

En el presente trabajo, se propone un modelo matemático en Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDOs) para explicar las dinámicas de crecimiento y muerte en una población bacteriana heterorresistente expuesta a estrés antimicrobiano. El modelo se inspira en el concepto de grado de AMR dado en Djidjou-Demasse et al. (2021) y en la simplicidad del enfoque que se desarrolla en Nikolaou and Tam (2006) para plantear un sistema que explique la dinámica de un número arbitrario de subpoblaciones con distintos grados de AMR, interconectadas entre sí a través de modificaciones fenotípicas que aumentan y disminuyen el grado de AMR. El modelo que se plantea es igual de flexible que aquellos basados en el paradigma sensible-resistente y conserva la misma estructura, de manera que es posible recuperar este enfoque asumiendo únicamente dos grados de AMR. Se analizan también la observabilidad e identificabilidad estructurales del modelo suponiendo una inhibición por antimicrobiano tipo Hill, separando los casos bacteriostático (el antimicrobiano impide la división celular) y bactericida (el inhibidor actúa promoviendo la muerte de las bacterias) (Pedreira et al., 2022). Para ello, se emplea STRIKE-GOLDD (Martínez-López et al., 2021), una toolbox de MATLAB que permite analizar la observabilidad e identificabilidad estructurales de cualquier sistema dinámico no lineal empleando geometría diferencial.

## 2. Planteamiento del modelo matemático

Partimos de una población bacteriana que evoluciona según el Problema de Valor Inicial (PVI)

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt}(t) = \mu(C)X(t) = (\mu_g(C) - \mu_d(C))X(t), \\ X(0) = X_0 \in \mathbb{R}^+, \end{cases} \quad (1)$$

donde  $X(t)$  denota la concentración de bacterias en cada tiempo  $t \geq 0$ , y  $\mu(C)$  es la tasa de crecimiento neto (el balance entre los ratios de crecimiento  $\mu_g(C)$ , y muerte  $\mu_d(C)$ ) cuando expone-mos a la población a una concentración  $C(t)$  de antimicrobiano.

Podemos encontrar gran variedad de expresiones en la literatura (empíricas o semi-empíricas, y otras inspiradas en argu-

mentos mecánicos) para describir la dependencia de los ratios de crecimiento y/o muerte con la concentración de antimicrobiano, dependiendo de si este ejerce un efecto bacteriostático (inhibiendo la división celular) y/o bactericida (incentivando la muerte celular) (Pedreira et al., 2022). Por ejemplo, la dependencia tipo Hill

$$\mu_g(C) = \mu_g^0 \frac{IC_{50g}^{H_g}}{IC_{50g}^{H_g} + C^{H_g}}, \quad (2)$$

$$\mu_d(C) = \mu_d^0 - \mu_k \frac{C^{H_d}}{C^{H_d} + EC_{50d}^{H_d}}, \quad (3)$$

es ampliamente utilizada por su flexibilidad (Nikolaou and Tam, 2006; Pedreira et al., 2022), donde  $\mu_g^0$  y  $\mu_d^0$  representan los ratios de crecimiento y muerte intrínsecos (es decir, en ausencia de antimicrobiano),  $\mu_k$  es la tasa máxima de muerte celular inducida por el tratamiento,  $IC_{50g}$  y  $EC_{50d}$  denotan las concentraciones necesarias para lograr un 50 % del efecto bacteriostático y bactericida máximo, respectivamente, mientras que  $H_g$  y  $H_d$  son los coeficientes de Hill, que modulan la forma de la curva.

Supongamos ahora que la población es heteroresistente, de manera el antimicrobiano no actúa homogéneamente sobre las bacterias que la componen. Podemos introducir heteroresistencia en el PVI (1) modelando una nueva variable explicativa de la población, el grado de resistencia (o grado de AMR). Esta variable puede adquirir múltiples significados y relacionarse con distintos indicadores de resistencia (como la permeabilidad o el espesor de la membrana celular, por ejemplo) dependiendo de la complejidad que se desee añadir al modelo. Una interpretación biológica sencilla se proporciona en Djidjou-Demasse et al. (2021), donde los autores definen el grado de AMR como

$$r := \frac{\log(\text{MIC}_r / \text{MIC}_0)}{\log(\text{MIC}_1 / \text{MIC}_0)}, \quad (4)$$

siendo  $\text{MIC}_r$ ,  $\text{MIC}_0$  y  $\text{MIC}_1$  las concentraciones inhibitorias mínimas asociadas a las subpoblaciones con grados de resistencia  $r$ , 0 (subpoblación sensible estándar) y 1 (subpoblación resistente estándar), respectivamente.

En este trabajo, el grado de AMR se modela como una v.a. discreta  $r$  que toma  $N > 1$  valores  $\{r_i \mid i = 1, \dots, N\} \subset [0, 1]$  (ordenados de menor a mayor, sin pérdida de generalidad), donde  $r_1 = 0$  y  $r_N = 1$  representan sensibilidad y resistencia totales, respectivamente. Estrictamente hablando, el grado de AMR se distribuye en la población de manera continua, como en Djidjou-Demasse et al. (2021). Sin embargo, asumiendo una discretización en  $N$  elementos lo bastante fina de  $r$ , se obtiene una buena aproximación del comportamiento real de la población heteroresistente, a la vez que se simplifica notablemente su estudio (Nikolaou and Tam, 2006). De esta manera, a cada uno de los valores  $\{r_i \mid i = 1, \dots, N\}$  que toma la v.a.  $r$ , se asocia una subpoblación de bacterias  $X_i(t) = X(r_i, t)$  con grado de AMR  $r_i$ , de forma que la frecuencia  $f_i(t)$  de la  $i$ -ésima subpoblación en la población total,

$$f_i(t) = \frac{X_i(t)}{X(t)}, \quad X(t) = \sum_{i=1}^N X_i(t), \quad 1 \leq i \leq N, \quad (5)$$

devuelve la probabilidad de que la población muestre grado de AMR  $r_i$  para cada  $t \geq 0$ . Se tiene así que  $\{f_i(t) \mid i = 1, \dots, N\}$  es la función densidad de probabilidad (FDP) de la v.a. discreta  $r$ .

Para explicar la evolución de las distintas subpoblaciones que componen la población heteroresistente, si la distribución inicial de AMR es  $\{f_i(0) \mid i = 1, \dots, N\}$ , se propone el PVI

$$\begin{cases} \frac{dX_i}{dt}(t) = \sum_{j \neq i=1}^N (\xi_{ji} X_j(t) - \xi_{ij} X_i(t)) + \mu_i(C) X_i(t), \\ X_i(0) = X_0 f_i(0), \end{cases} \quad (6)$$

donde  $\xi_{ij}$  es la tasa de modificación fenotípica desde grado de AMR  $r_i$  hasta grado  $r_j$ , para  $1 \leq i, j \leq N$  e  $i \neq j$ , mientras que

$$\mu_i(C) = \mu_g^i(C) - \mu_d^i(C), \quad 1 \leq i \leq N, \quad (7)$$

es el ratio de crecimiento neto de las bacterias con grado de AMR  $r_i$  (el balance entre los ratios de crecimiento  $\mu_g^i(C)$  y muerte  $\mu_d^i(C)$  de la  $i$ -ésima subpoblación). Notar que, para la subpoblación totalmente resistente ( $i = N$ ), los ratios de crecimiento y muerte permanecen constantes con la concentración de antimicrobiano ( $\mu_g^N(C) \equiv \mu_g^N$  y  $\mu_d^N(C) \equiv \mu_d^N$ ).

Para modelar la dependencia de los ratios de crecimiento y muerte poblacionales con el grado de AMR podemos escoger, entre otras opciones, el siguiente modelo lineal sencillo

$$\mu_g^i(C) = \mu_g(r_i, C) = \mu_g^1(C) + r_i (\mu_g^N - \mu_g^1(C)), \quad (8)$$

$$\mu_d^i(C) = \mu_d(r_i, C) = \mu_d^1(C) + r_i (\mu_d^N - \mu_d^1(C)), \quad (9)$$

puediendo reflejar en los ratios (8) y (9) el coste biológico de AMR (Melnik et al., 2015) tomando

$$\mu_g^N < \mu_g^1(0), \quad \mu_d^1(0) < \mu_d^N. \quad (10)$$

Así, las expresiones (8) y (9) implican un desarrollo más rápido de las bacterias cuanto menor sea su grado de AMR, hasta que no se alcance en la población cierta concentración límite de antimicrobiano que favorezca la selección de resistencia. Notar que es posible considerar otras dependencias con mayor significado biológico (conectando el grado de AMR con los parámetros de la inhibición tipo Hill (2) y/o (3), por ejemplo), pero todavía no hay demasiados datos al respecto. Tomamos, pues, (8) y (9) como una primera aproximación sencilla que permite captar, al menos, el coste biológico de AMR.

El modelo (6)–(10) es lo bastante genérico para incluir modificaciones fenotípicas “hacia delante” (*forward*) y “hacia atrás” (*backward*). Podemos escoger, por ejemplo, un ratio de modificación fenotípica que decaiga exponencialmente (desde un valor máximo  $\xi_M > 0$ ) con el salto entre grados de AMR,

$$\xi_{ij} = \xi_M \exp(-k_\xi |r_j - r_i|), \quad 1 \leq i, j \leq N, \quad i \neq j, \quad (11)$$

donde  $k_\xi$  marca la rapidez del decaimiento. Notar que (11) permite saltos de resistencia no secuenciales, pudiéndose alcanzar grado de AMR  $r_j$  desde  $r_i$  en una única modificación fenotípica, sin necesidad de que  $j = i - 1$  o  $j = i + 1$ , aunque esta situación es mucho menos frecuente (Berríos-Caro et al., 2021).

El modelo en EDOs (6)–(11) es lineal con respecto al estado, pudiéndose escribir en forma matricial

$$\frac{d\vec{X}}{dt}(t) = A(C)\vec{X}(t), \quad \vec{X}(t) = (X_1(t) \ \dots \ X_N(t))^T, \quad (12)$$

donde las componentes de la matriz de coeficientes  $A(C)$  son

$$a_{ij}(C) = \xi_{ji} = \xi_{ij} = a_{ji}(C), \quad 1 \leq i, j \leq N, \quad i \neq j,$$

$$a_{ii}(C) = \mu_i(C) - \sum_{j \neq i=1}^N \xi_{ij}.$$

Así, el sistema (12) tiene una (única) solución analítica siempre y cuando la matriz  $A(C)$  no dependa del tiempo ( $C(t) \equiv C$ ).

Por otro lado, sumando las EDOs (6) para  $i = 1, \dots, N$ , se tiene que la concentración total  $X(t)$  satisface (en media) el PVI

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt}(t) = \bar{\mu}(r, C)X(t), \\ X(0) = X_0, \end{cases} \quad (13)$$

para  $\bar{\mu}(r, C)$  la tasa (media) de crecimiento neto poblacional

$$\bar{\mu}(r, C) = \sum_{i=1}^N \mu_i(C) f_i(t), \quad (14)$$

de forma que la FDP (5) verifica el sistema de EDOs

$$\frac{df_i}{dt}(t) = \sum_{j \neq i=1}^N (\xi_{ji} f_j(t) - \xi_{ij} f_i(t)) + (\mu_i(C) - \bar{\mu}(r, C)) f_i(t). \quad (15)$$

### 3. Análisis de la observabilidad e identificabilidad estructurales del modelo

Una propiedad interesante del modelo (6)–(11) reside en su flexibilidad para incorporar de manera sencilla distintas funcionalidades (como las expresiones tipo Hill (2) y (3)) para describir la inhibición del antimicrobiano sobre el conjunto de la población heterorresistente. El efecto del antimicrobiano entra en el sistema a través de los ratios de crecimiento y muerte de la subpoblación enteramente sensible, de manera que es suficiente con modelar la inhibición sobre dichas bacterias para obtener los ratios de la población en general, empleando las expresiones (8) y (9), respectivamente.

En esta sección, analizamos la observabilidad e identificabilidad estructurales del modelo (6)–(11) con ayuda de la toolbox STRIKE-GOLDD, considerando que el antimicrobiano ejerce un efecto inhibitorio tipo Hill (ya sea bacteriostático (2) o bactericida (3)), y empleando únicamente medidas  $y(t)$  del recuento total de bacterias

$$y(t) = X(t) = \sum_{i=1}^N X_i(t), \quad N > 1. \quad (16)$$

Dado que la estructura del modelo (6)–(11) permanece inalterada para un número arbitrario de subpoblaciones  $N > 2$  (los parámetros son los mismos independientemente del tamaño del sistema, así como las dinámicas de los estados intermedios entre sensibilidad y resistencia totales son análogas entre sí), los resultados de identificabilidad y observabilidad estructural serán independientes de la discretización escogida para el grado de AMR. En el caso extremo  $N = 2$ , nótese que la expresión escogida para la tasa de modificación fenotípica (11) conlleva una sobreparametrización del modelo, dado que

$$\xi = \xi_{12} = \xi_{21},$$

de manera que la velocidad de decaimiento  $k_\xi$  del ratio de modificación fenotípico se convierte en un parámetro carente de sentido, al mantenerse  $\xi$  constante en el sistema.

#### 3.1. Caso bacteriostático

Cuando el antimicrobiano ejerce sobre la población un efecto bacteriostático tipo Hill (2), se tiene

$$\mu_1(C) = \mu_g^1(C) - \mu_d^1(C) = \mu_{gS}^0 \frac{IC_{50g}^{H_d}}{IC_{50g}^{H_g} + C^{H_g}} - \mu_{dS}^0, \quad (17)$$

donde  $\mu_{gS}^0$  y  $\mu_{dS}^0$  son los ratios intrínsecos de crecimiento y muerte, respectivamente, de las bacterias totalmente sensibles

$$\mu_{gS}^0 = \mu_g^1(0), \quad \mu_{dS}^0 = \mu_d^1(0). \quad (18)$$

De esta forma, los parámetros implicados en el modelo de heteroresistencia bacteriostático (6)–(11) y (17), son (salvo para  $N = 2$ , en cuyo caso el parámetro  $k_\xi$  desaparece)

$$\theta = (\mu_{gS}^0, \mu_{dS}^0, \mu_N, IC_{50g}, H_g, \xi_M, k_\xi), \quad (19)$$

Un análisis de la observabilidad e identificabilidad estructural con la toolbox STRIKE-GOLDD devuelve que el modelo (6)–(11) con inhibición bacteriostática tipo Hill (17), es estructuralmente observable e identificable empleando mediciones de recuento total de bacterias (16) para un número arbitrario  $N$  de subpoblaciones con distintos grados de AMR, siempre y cuando la concentración de antimicrobiano en el cultivo no se mantenga constante con el tiempo. Esto se debe a la necesidad de excitar suficientemente la dependencia tipo Hill (2) (que incorpora al modelo dos parámetros adicionales,  $IC_{50g}$  y  $H_g$ ) a través del perfil de concentraciones. Por otro lado, el modelo (6)–(11) y (17) es estructuralmente observable e identificable con el enfoque multi-experimento Ovchinnikov et al. (2022), cuando se trabaja con recuento total de bacterias (16) y empleando (al menos) cuatro experimentos a distintas concentraciones constantes de antimicrobiano (para conseguir suficiente variabilidad en la inhibición (2) como para estimar separadamente la contribución de los cuatro parámetros que intervienen).

En resumen, el modelo con inhibición bacteriostática propuesto es apropiado para calibración, de manera que podemos estimar (al menos teóricamente) los valores de sus parámetros y la distribución inicial de heteroresistencia en la población, siempre y cuando se disponga de medidas de recuento total de bacterias (16) a cuatro concentraciones (constantes) de antimicrobiano distintas, o empleando un único experimento con un perfil de concentraciones variable en el tiempo.

#### 3.2. Caso bactericida

Supongamos ahora que el antimicrobiano ejerce un efecto bactericida (tipo Hill) sobre la población, de manera que

$$\mu_1(C) = \mu_g^1(C) - \mu_d^1(C) = \mu_{gS}^0 - \left( \mu_{dS}^0 - \mu_k \frac{C^{H_d}}{C^{H_d} + EC_{50d}^{H_d}} \right) \quad (20)$$

En este caso, es imposible estimar por separado el valor de los ratios intrínsecos de crecimiento  $\mu_{gS}^0$  y muerte  $\mu_{dS}^0$  de la población sensible, pues tan sólo intervienen en el modelo a través de (20) combinados en la tasa de crecimiento neto

$$\mu_S^0 = \mu_{gS}^0 - \mu_{dS}^0.$$

Un análisis con la toolbox STRIKE-GOLDD devuelve que el modelo (6)–(11), junto con la inhibición bactericida (20), es estructuralmente observable empleando la función de medida (16), y considerando un número arbitrario  $N$  de subpoblaciones con distintos grados de AMR, sea cual sea el perfil de concentraciones escogido para el antimicrobiano. Esto implica que, al menos teóricamente, podemos estimar la distribución inicial de heteroresistencia en la población empleando únicamente información del recuento total de bacterias (16), aunque la concentración de antimicrobiano en el cultivo se mantenga constante con el tiempo (notar la diferencia con el caso bacteriostático, donde el sistema era completamente no observable cuando dicha concentración se mantiene constante).

Por otro lado, los parámetros del modelo bactericida (exceptuando el caso  $N = 2$ , donde el parámetro  $k_\xi$  desaparece),

$$\theta = (\mu_S^0, \mu_N, \mu_k, EC_{50d}, H_d, \xi_M, k_\xi), \quad (21)$$

son estructuralmente identificables siempre que la concentración de antimicrobiano no se mantenga constante durante el experimento. Es decir, para lograr la identificabilidad estructural, es necesario emplear un perfil variable de concentraciones que excite suficientemente el sistema dinámico (cualquier función derivable con derivada primera distinta de cero, por ejemplo).

En conclusión, es posible (al menos teóricamente) calibrar sin ambigüedad los parámetros y la distribución inicial de heteroresistencia del modelo (6)–(11) con inhibición bactericida tipo Hill (20), empleando datos de recuento total de bacterias (16) a cuatro concentraciones distintas de antimicrobiano, pero también a partir de un único experimento en el que el perfil de concentraciones excite suficientemente la dinámica del cultivo.

#### 4. Un caso de estudio sencillo basado en selección

En esta sección, tratamos de ilustrar la importancia de explorar en el modelado de AMR la nueva información experimental proporcionada por los test de heteroresistencia, aún empleando la versión más simplificada del modelo (6)–(11) en la que no se permiten modificaciones fenotípicas del grado de AMR, es decir,  $\xi_M = 0$  en (11). Vamos a considerar, por ejemplo, un antimicrobiano con efecto bactericida tipo Hill (3).

Supongamos que partimos de una situación real con una población de bacterias muy poco heteroresistente, compuesta mayoritariamente de subpoblación sensible (con una frecuencia del 98 % en la población total, por ejemplo) y resistente (con frecuencia del 1.5 %), pero con una ínfima frecuencia de resistencia intermedia (0.5 %). Si no se permiten alteraciones en el grado de AMR (ya sea por la escala de tiempo estudiada o porque la tasa de modificación fenotípica se considera despreciable), la intuición puede llevar a concluir que el modelo clásico considerando únicamente dos grados de AMR, sensibilidad y resistencia, aproxima satisfactoriamente la evolución de la población escasamente heteroresistente, donde además las bacterias no pueden variar su grado de AMR.

En tal situación, podría parecer que el consumo de tiempo y recursos en realizar un test experimental para determinar la distribución inicial de heteroresistencia carece de sentido. Sin embargo, simulando la situación real con el modelo de  $N = 3$  subpoblaciones, vamos a ver cómo errores prácticamente imperceptibles a la hora de determinar la distribución inicial de

heteroresistencia pueden llevar al completo fracaso de la predicción arrojada por el modelo clásico de dos subpoblaciones.

Supongamos así que el test de susceptibilidad clásico arroja que un 99 % de la población inicial es sensible al tratamiento con antimicrobiano, y el otro 1 % muestra una resistencia total al compuesto (es decir, se atribuye la frecuencia intermedia inicial a la población sensible). En la Figura 1 se muestra la evolución en el recuento total de bacterias para el modelo (6)–(11), con efecto bactericida (3) y  $N = 2$  (caso A), frente al recuento real con un tercer grado de AMR ( $N = 3$ ). En este caso, puede verse cómo el modelo de dos subpoblaciones subestima el crecimiento real (pues la población se considera inicialmente más sensible de lo que en realidad es), llegando a acumular un error relativo del 10 % (aproximadamente) a las 72 horas.

Por otro lado, si la ínfima frecuencia inicial de la subpoblación con grado de AMR intermedio (no detectable por el test de susceptibilidad clásico) se atribuye a la subpoblación resistente, la Figura 1 muestra cómo el modelo con  $N = 2$  (caso B) sobrestima la concentración real de bacterias (pues la población inicial se considera más resistente de lo que en realidad es), con un error relativo del 25 % tras 72 horas de exposición. En resumen, cuando no modelamos correctamente la distribución inicial de heteroresistencia de la población, en el mejor de los casos el modelo clásico puede llevar a emplear concentraciones excesivas de antimicrobiano para inhibir el crecimiento de la población (incurriendo en un gasto adicional de recursos), mientras que, en el peor de los escenarios, puede llevar a infravalorar la concentración total de bacterias (prediciendo incluso una falsa eliminación de la infección).

#### 5. Conclusiones y trabajo futuro

En este trabajo, se presenta un modelo matemático para describir las dinámicas de crecimiento y muerte en una población bacteriana heteroresistente expuesta a estrés antimicrobiano. El modelo incorpora heterogeneidad en la respuesta de la población al tratamiento a través de una nueva variable explicativa; el grado de AMR, que permite clasificar las bacterias en un número arbitrario de subpoblaciones (según el nivel de precisión requerido para graduar la heteroresistencia) con respuesta homogénea. Así, se conectan las propiedades de las bacterias a nivel población (ratios de crecimiento y muerte) con su grado de AMR, teniendo en cuenta el coste biológico de la resistencia. Tratamos de ilustrar también la flexibilidad del modelo para introducir el efecto inhibitorio del antimicrobiano, de forma que resulta sencillo incorporar distintas funcionalidades bien establecidas en la literatura (como la dependencia tipo Hill).

Se proporciona también un análisis de la observabilidad e identificabilidad estructurales del modelo, empleando datos de recuento bacteriano total (medida estándar en microbiología) y considerando un número arbitrario de subpoblaciones con distintos grados de AMR. Establecemos que, en efecto, el modelo es estructuralmente observable (siendo posible estimar la frecuencia inicial de cada subpoblación) e identificable, por lo que resulta apropiado para calibración bajo circunstancias realistas (midiendo recuento de bacterias a cuatro concentraciones constantes de antimicrobiano, por ejemplo), así como para estimar la evolución de la heteroresistencia en la población.

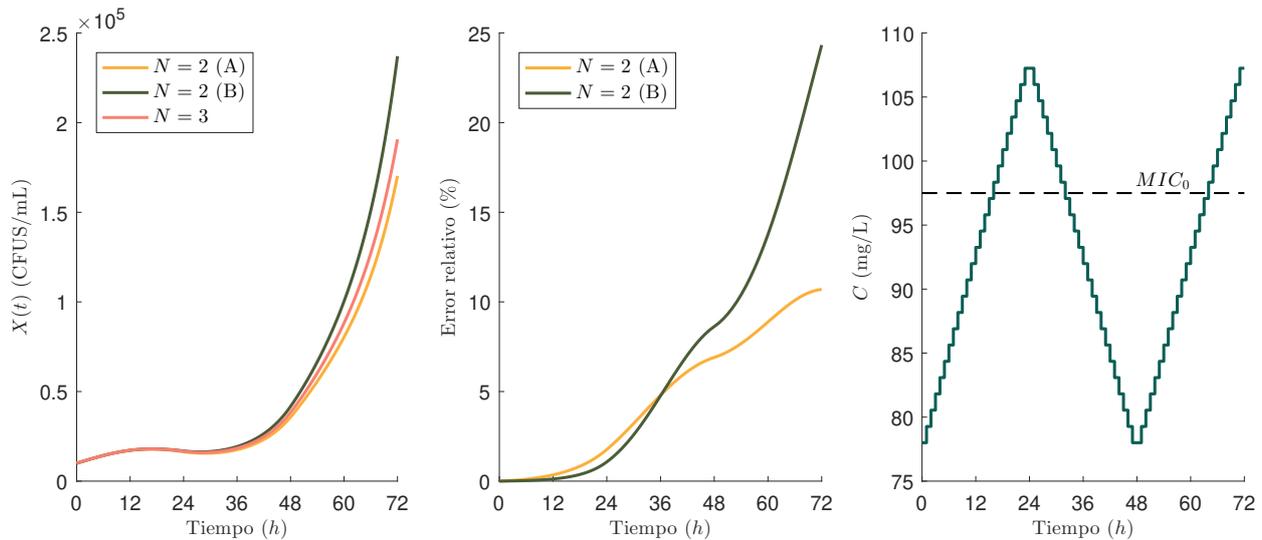


Figura 1: Comparación entre el recuento total de bacterias obtenido con el modelo de heterorresistencia para  $N = 3$  subpoblaciones y el modelo clásico con  $N = 2$  asumiendo la frecuencia inicial de la subpoblación adicional como sensible (A) o resistente (B) (izquierda). Evolución de los errores relativos (centro). Concentración aplicada de antimicrobiano (derecha). Los parámetros escogidos son  $\mu_S^0 = 1.3h^{-1}$ ,  $\mu_N = 0.1h^{-1}$ ,  $\mu_k = 1.7h^{-1}$ ,  $EC_{50d} = 30mg L^{-1}$ ,  $H_d = 1$  y  $X_0 = 1 \cdot 10^4$ .

En trabajos futuros, se pretende validar el modelo propuesto con la nueva información experimental proporcionada por los test de heterorresistencia para explicar datos de recuento bacteriano y obtener así la evolución de heterorresistencia en la población, comparando con distribuciones reales obtenidas por citometría de flujo, por ejemplo, y estudiando además la observabilidad e identificabilidad prácticas del modelo (posibilidad real de estimar los parámetros y condiciones iniciales empleando métodos de estimación paramétrica y optimización). También se pretenden explorar distintas extensiones del modelo para relacionar la heterorresistencia con mecanismos biológicos bien establecidos, como competencia por los recursos entre las subpoblaciones, más efectiva cuanto menor sea el coste biológico de AMR, o transferencia horizontal de resistencia.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias al apoyo de las ayudas RTI2018-093560-J-I00 financiadas por MCIN/AEI/10.13039/501100011033, “FEDER Una forma de hacer Europa”, las ayudas del CSIC 20213AT001 y 202270I193 y la ayuda de la Xunta de Galicia IN606A-2020/028.

## Referencias

- Alexander, H.E., Leidy, G., 1947. Mode of action of streptomycin on type b hemophilus influenzae:ii. nature of resistant variants. The journal of experimental medicine 85, 607–621. doi:10.1084/jem.85.6.607.
- Berrios-Caro, E., Gifford, D.R., Galla, T., 2021. Competition delays multi-drug resistance evolution during combination therapy. Journal of theoretical biology 509. doi:10.1016/j.jtbi.2020.110524.
- Djidjou-Demasse, R., Sofonea, M.T., Choisy, M., Alizon, S., 2021. Within-host evolutionary dynamics of antimicrobial quantitative resistance. URL: <https://hal.science/hal-03194023>. a preprint peer-reviewed and recommended by PCI Mathematical & Computational Biology (<https://mcb.peercommunityin.org/>).
- El-Halfawy, O.M., Valvano, M.A., 2015. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. Clinical microbiology reviews 28, 191–207. doi:doi.org/10.1128/CMR.00058-14.

- Fujikawa, H., Munakata, K., Sakha, M.Z., 2014. Development of a competition model for microbial growth in mixed culture. Biocontrol science 19, 61–71. doi:10.4265/bio.19.61.
- Gothwal, R., Thatikonda, S., 2020. Modeling transport of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environment using stochastic differential equations. Scientific Reports 10. doi:10.1038/s41598-020-72106-3.
- Hernández-Beltrán, J.C.R., San Millán, A., Fuentes-Hernández, A., Peña-Miller, R., 2021. Mathematical models of plasmid population dynamics. Frontiers in microbiology 12. doi:10.3389/fmicb.2021.606396.
- Kumar, S.B., Arnipalli, S.R., Ziouzenkova, O., 2020. Antibiotics in food chain: The consequences for antibiotic resistance. Antibiotics 9. doi:https://doi.org/10.3390/antibiotics9100688.
- Martínez-López, N., Vilas, C., García, M.R., 2021. Comparativa entre modelos estocásticos de crecimiento bacteriano a distintas escalas, in: XLII Jornadas Automática. Servicio de Publicacións da UDC, pp. 442–449. doi:10.17979/spudc.9788497498043.442.
- Melnyk, A.H., Wong, A., R, R.K., 2015. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. Evolutionary Applications 8, 273–283. doi:https://doi.org/10.1111/eva.12196.
- Mena, H., Pfurtscheller, L.M., Romero-Leiton, J.P., 2020. Random perturbations in a mathematical model of bacterial resistance: Analysis and optimal control. Mathematical biosciences and engineering:MBE 17, 4477–4499. doi:doi.org/10.3934/mbe.2020247.
- Murray, C.J., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Naghavi, M., y col., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet 399, 629–655. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- Nikolaou, M., Tam, V.H., 2006. A new modeling approach to the effect of antimicrobial agents on heterogeneous microbial populations. Journal of Mathematical Biology 52, 154–182. doi:https://doi.org/10.1007/s00285-005-0350-6.
- Ovchinnikov, A., Pillay, A., Pogudin, G., Scanlon, T., 2022. Multi-experiment parameter identifiability of odes and model theory. SIAM Journal on Applied Algebra and Geometry 6, 339–367. doi:10.1137/21M1389845.
- Pedreira, A., Vázquez, J.A., García, M.R., 2022. Kinetics of bacterial adaptation, growth, and death at didecylidimethylammonium chloride sub-mic concentrations. Frontiers in Microbiology 13. doi:10.3389/fmicb.2022.758237.
- Scheler, O., Makuch, K., Debski, P., Horka, M., Ruszczak, A., Pacocha, N., Sozanski, K., Olli-Pekka, S., Witold, P., Piotr, G., 2020. Droplet-based digital antibiotic susceptibility screen reveals single-cell clonal heteroresistance in an isogenic bacterial population. Scientific Reports 10, 3282. doi:10.1038/s41598-020-60381-z.
- Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis. part i: causes and threats. P & T: a peer-reviewed journal for formulary management 40, 277–283.
- Zhong, X., Krol, J.E., Top, E.M., Krone, S.M., 2010. Accounting for mating pair formation in plasmid population dynamics. Journal of theoretical biology 262, 711–719. doi:10.1016/j.jtbi.2009.10.013.