

**Desarrollo de nuevos
procedimientos rápidos y
eficaces para evaluar *in situ* la
sensibilidad o resistencia
bacteriana a distintos tipos de
antibióticos**

Fátima María Otero Fariña

Tesis doctoral UDC 2024

Director: José Luis Fernández García

Tutor: Andrés Martínez Lage

Programa Oficial de Doctoramiento en Biología Celular y
Molecular



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



JOSÉ LUIS FERNÁNDEZ GARCÍA, Doctor en Medicina y Cirugía, jefe del grupo de Genética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y jefe de servicio del Laboratorio de Biología Molecular y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia,

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral, titulada “Desarrollo de nuevos procedimientos rápidos y eficaces para evaluar *in situ* la sensibilidad o resistencia bacteriana a distintos tipos de antibióticos”, que para optar al título de Doctora en Biología presenta Doña **Fátima María Otero Fariña**, ha sido realizada bajo mi dirección en el laboratorio de Genética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y en el Laboratorio de Biología Molecular y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia y que, hallándose concluida, autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

A Coruña, 22 de abril de 2024

Fdo. José Luis Fernández García



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

ANDRÉS MARTÍNEZ LAGE, Doctor en Biología, Catedrático de Genética de la Universidad de A Coruña,

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral, titulada “Desarrollo de nuevos procedimientos rápidos y eficaces para evaluar *in situ* la sensibilidad o resistencia bacteriana a distintos tipos de antibióticos”, presentada por Doña **Fátima María Otero Fariña** para optar al título de Doctora en Biología y dirigida por el Dr. José Luis Fernández García, ha sido realizada bajo mi tutela.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

A Coruña, 22 de abril de 2024

Fdo. Andrés Martínez Lage

Los trabajos que han dado lugar a esta tesis han sido financiados por los proyectos autonómicos, nacionales y europeos que se señalan a continuación:

~ 10CSA916020PR. “Desarrollo de un procedimiento simple para determinar rápidamente *in situ* la sensibilidad o resistencia bacteriana a antibióticos que actúan sobre la pared celular”. Xunta de Galicia. (43.700 euros). Años 2010-2013.

~ Project Number 278232. Optimisation of treatment with off-patent antimicrobial agents of ventilator-associated pneumonia (VAP) (MagicBullet). European Community. Seventh Framework Programme. (337.626,00 euros). Años 2012-2015.

~ PI14/01346. “Desarrollo y validación de un procedimiento simple para la determinación rápida de la resistencia bacteriana a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas”. Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). (187.852,50 euros). Años 2015-2017. Prorrogado hasta marzo de 2019.

~ RD16/0016/0006. “Red temática de investigaciones cooperativa: Red española de investigación en patología infecciosa”. Años 2013-2016 y 2017-2022.

Así mismo, estos estudios se encuentran relacionados con las siguientes patentes:

~ Method for determining DNA fragmentation in microorganisms. (2008) (WO/2008/056016). Universidad Autónoma de Madrid.

~ Method for evaluating bacterial cell wall integrity. (WO/2013/014324) (2013). Universidad Autónoma de Madrid.

~ Method for the rapid determination of susceptibility or resistance of bacteria to antibiotics. (13382271.8 - 1405) (2013). ABM Technologies, LLC.

~ Procedure for the rapid determination of bacterial susceptibility to antibiotics that inhibit protein synthesis. (WO2016118469) (2015). ABM Technologies, LLC.

A mi padre

Agradecimientos

De pequeña aprendí que la vida puede cambiar en cuestión de segundos. Nos marcamos metas y les damos una importancia que no siempre tienen. A veces nos olvidamos del camino, y si por algún motivo, todo cambia, solo habremos disfrutado lo que llevemos recorrido.

Poder defender esta tesis es una meta alcanzada, sin duda, pero si pongo el corazón en la mano, me quedo con el camino. Me quedo con las mañanas de laboratorio; los ratos de café; las noches de ordenador; los experimentos que salen a la primera y, sobre todo, los que no. Me quedo con lo vivido, lo aprendido y lo compartido con personas realmente maravillosas.

En primer lugar, mi profundo y más sincero agradecimiento al Dr. José Luis Fernández, por darme la oportunidad de hacer esta tesis con él. Por seguir asombrándome con cada una de sus ideas. Por ser el mayor ejemplo de humildad, trabajo, esfuerzo y entrega. Gracias por todos tus consejos profesionales y sobre todo personales. Necesitaría más páginas de las que tiene esta tesis, para agradecerte todos estos años.

Gracias al Dr. Andrés Martínez Lage, por ser mi paciente tutor. Sin tus clases de Genética Humana, probablemente hoy no estaría aquí.

Gracias al Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, ya que sin su colaboración hubiese sido imposible realizar este proyecto. En particular a su director, el Dr. Germán Bou, un gran ejemplo de dedicación a la ciencia, que siempre está dispuesto a tender la mano.

Gracias también, al Servicio de Microbiología del Hospital Virgen del Rocio de Sevilla y al Instituto de Salud Carlos III (Dra. Fenoll) por proporcionarnos desinteresadamente parte de las cepas de estos trabajos.

Gracias a los compañeros del INIBIC, en especial a los de Microbiología: a Mari Carmen, a Mariki, a Eva, ... por toda la colaboración recibida.

Gracias a la Fundación Profesor Novoa Santos y a todo su personal, por ayudarnos constantemente. Gracias Pilar por tu inestimable ayuda en la consecución y gestión de los proyectos, siempre dispuesta, pendiente y amable.

Gracias al Centro Oncológico de Galicia, en especial a Dña. Lucía Cachafeiro, por permitirme emplear sus instalaciones en el desarrollo de esta tesis. Gracias a todo su personal por hacerme sentir una más y por ayudarme cariñosamente cada vez que lo he necesitado. Sin su valiosa ayuda nada de esto hubiese sido posible.

Gracias a los compañeros del laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología, del Oncológico. A los del principio; Lourdes, Belén, Susana, que hicieron que me enamorara de la investigación y la clínica. A "mis compañeras de bacterias" María y Rebeca con las que compartí horas y horas de experimentos, viajes y aventuras. A Nerea por cuidarme y quererme tanto, que apoyo más importante. A Raquel, porque, me haces el día a día mucho más ameno y sencillo, por todo lo aprendido. A Arantxa por no dejar nunca de enseñarme y sorprenderme. A Ana por dar su toque de juventud y estar siempre dispuesta a ayudar. Y a Rebe, una compañera con mayúsculas; uno de

los mayores lujos de este tiempo ha sido trabajar contigo y aprender de ti.

Gracias a los compañeros de la Unidad de Genética del CHUAC, por hacerme sentir como en casa. Al Dr. Goyanes por sus conversaciones cargadas de lecciones, a Asun por todas sus cariñosas recomendaciones. A Berta, Elisa, Cristina, Sole, Elena, Pilar, Charo, Inma, Isa, Mery, Silvia, Raquel, Iria, ... por los buenos ratos de cafés y comidas y todas las manos recibidas cada vez que lo necesité. A Rosa, por todas las veces que me apoyaste. A Loli por ser como una madre en el laboratorio. A Montse, por todas las que te debo y por ser un gran ejemplo. A Alex por creer en mí mucho más que yo misma, por enseñarme y apoyarme desde el minuto cero. A Isidoro, por todas las horas de análisis de imagen, por inculcarme el amor a la citogenética, por la complicidad, por las risas, por tanto. No cambiaría estos años con vosotros por nada.

Tengo que agradecer también a las personas que aparentemente no tienen nada que ver con la realización de esta tesis, y a su vez tienen tanto. A mis maestros y a Uca, por ser la mejor profesora de Biología, ejemplo de disciplina, exigencia y dedicación. A mi familia, en especial a mi hermano y a mi madre, por estar siempre ahí; a Jota, el más sufridor de todo este proceso, y el pilar de mi vida, que no deja de creer en mí. A mis ahijadas, que son mis pequeños motores. Y a mis amigos que se han ido convirtiendo en la familia que escoges.

Gracias a la vida, que fue generando todas las casualidades que llevaron a que todo esto fuese así.

Resumen

RESUMO

A resistencia antibiótica é un grave problema de saúde pública mundial. Os antibiogramas clásicos habitualmente requiren 18-24 horas, pero en situacións críticas pode ser decisiva unha caracterización rápida e precisa da cepa bacteriana.

Esta tese desenvolve procedementos para determinar a sensibilidade/resistencia antibiótica en bacterias de alta patoxenicidade, de forma simple, rápida e eficaz. Todos teñen en común a inmovilización das bacterias nun microxel para a súa observación baixo microscopía de fluorescencia.

Para cada tipo de antibiótico estableceuse e validouse un parámetro fenotípico que permite discriminar cepas resistentes de sensibles. As quinolonas, que inducen roturas do ADN, foron avaliadas mediante visualización directa da fragmentación do nucleóide. No caso de antibióticos que inhiben a síntese do peptidoglicano, a afectación da parede bacteriana determinouse mediante a promoción da liberación do nucleóide ou da elongación celular. A colistina, que actúa sobre a membrana plasmática, mostrou afectación secundaria en ADN e parede celular. Os antibióticos que inhiben a síntese proteica, avaliáronse por prevención de procesos autolíticos inducidos en Gram-positivos e da elongación por resposta SOS provocada por mitomicina C en Gram-negativos.

Os resultados obtivéronse entre 40-210 minutos, concordando practicamente cos antibiogramas estándar.

RESUMEN

La resistencia antibiótica es un grave problema de salud pública mundial. Los antibiogramas clásicos habitualmente requieren 18-24 horas, pero en situaciones críticas puede ser decisiva una caracterización rápida y precisa de la cepa bacteriana.

Esta tesis desarrolla procedimientos para determinar la sensibilidad/resistencia antibiótica en bacterias de alta patogenicidad, de forma simple, rápida y eficaz. Todos tienen en común la inmovilización de las bacterias en un microgel para su observación bajo microscopía de fluorescencia.

Para cada tipo de antibiótico se estableció y validó un parámetro fenotípico que permite discriminar cepas resistentes de sensibles. Las quinolonas, que inducen roturas del ADN, fueron evaluadas mediante visualización directa de la fragmentación del nucleóide. En el caso de antibióticos que inhiben la síntesis del peptidoglicano, la afectación de la pared bacteriana se determinó mediante la promoción de la liberación del nucleóide o de la elongación celular. La colistina, que actúa sobre la membrana plasmática, mostró afectación secundaria en ADN y pared celular. Los antibióticos que inhiben la síntesis proteica, se evaluaron por prevención de procesos autolíticos inducidos en Gram-positivos y de la elongación por respuesta SOS provocada por mitomicina C en Gram-negativos.

Los resultados se obtuvieron entre 40-210 minutos, concordando prácticamente con los antibiogramas estándar.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a serious global public health problem. Classical antibiograms usually require 18-24 hours, but in critical situations a rapid and accurate characterisation of the bacterial strain can be decisive.

This thesis develops procedures to determine antibiotic sensitivity/resistance in highly pathogenic bacteria in a simple, fast and efficient way. All of them have in common the immobilisation of the bacteria in a microgel for observation under fluorescence microscopy.

For each type of antibiotic, a phenotypic parameter was established and validated to discriminate between resistant and sensitive strains. Quinolones, which induce DNA breaks, were evaluated by direct visualisation of nucleoid fragmentation. For antibiotics that inhibit peptidoglycan synthesis, bacterial wall damage was determined by promoting nucleoid release or cell elongation. Colistin, which acts on the plasma membrane, showed secondary involvement in DNA and cell wall. Antibiotics that inhibit protein synthesis were evaluated for the prevention of autolytic processes induced in Gram-positives and elongation due to SOS response caused by mitomycin C in Gram-negatives.

The results were obtained between 40-210 minutes, in close agreement with standard antibiograms.

Índice

ABREVIATURAS	33
INTRODUCCIÓN	45
1. Microorganismos de alta patogenicidad	47
1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	47
1.2. <i>Escherichia coli</i>	50
1.3. <i>Enterococcus faecalis</i>	53
1.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	54
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
1.6. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	59
2. Mecanismos de acción de los antibióticos	61
2.1. Antibióticos que actúan en el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	62
2.1.1. Quinolonas	63
2.1.2. Rifamicinas	67
2.1.3. Nitrofuranos y nitroimidazoles	67
2.2. Antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana	68
2.2.1. β -lactámicos	71
2.2.2. Glucopéptidos	73
2.2.3. Fosfonopéptidos, isoxazolidinonas y bacitracina	74
2.3. Antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas	74
2.3.1. Aminoglucósidos	77
2.3.2. Tetraciclinas	78
2.3.3. Macrólidos	79
2.3.4. Oxazolidinonas	80
2.3.5. Lincosamidas	80

2.3.6. Anfenicoles	81
2.4. Antibióticos que actúan inhibiendo las funciones de la membrana citoplasmática	82
2.5. Antibióticos que actúan inhibiendo las vías metabólicas	85
3. Resistencia bacteriana a los antibióticos	86
3.1. Importancia de las resistencias	86
3.2. Mecanismos de resistencia bacteriana	90
3.2.1. Adquisición de genes de resistencia	91
3.2.2. Alteración de la permeabilidad de la membrana	94
3.2.3. Bombas de expulsión	96
3.2.4. Inactivación enzimática	98
3.2.4.1. β -lactamasas	99
3.2.4.2. Modificación de aminoglucósidos	101
3.2.4.3. Inactivación de macrólidos	101
3.2.5. Modificación de las dianas	102
3.2.6. Formación de biopelículas	104
3.2.7. Células persistentes	105
4. Test de sensibilidad antimicrobiana	106
4.1. Sistemas manuales	107
4.1.1. Métodos de dilución	107
4.1.1.1. Dilución en medio líquido	108
4.1.1.2. Dilución en agar	109
4.1.2. Métodos de difusión	110
4.1.2.1. Discos de difusión	110
4.1.2.2. Método del Épsilon test	111
4.2. Sistemas automatizados	112
4.3. Antibiogramas rápidos: Técnicas emergentes	114

4.3.1. Antibiogramas basados en el análisis de crecimiento bacteriano	115
4.3.2. Antibiogramas basados en el análisis de parámetros bioquímicos, metabólicos o fisiológicos	117
4.3.3. Test rápidos basados en técnicas de genética molecular	123
OBJETIVOS	127
DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD EXPERIMENTAL	135
CAPÍTULO I: Detección rápida de sensibilidad o resistencia a quinolonas	149
1. Introducción	151
2. Material	155
2.1. Reactivos y equipamiento técnico	155
2.2. Tinción para microscopía de fluorescencia	156
3. Métodos	157
3.1. Cultivo bacteriano e incubación con el antibiótico ..	157
3.2. Ensayo Micromax®	158
3.3. Análisis y clasificación de la muestra	160
4. Notas	161
CAPÍTULO II: Evaluación rápida de la resistencia a carbapenémicos y ciprofloxacino de cepas clínicas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	165
1. Introducción	167
2. Material y métodos	171
2.1. Cepas bacterianas	171
2.2. Ensayo de la fragmentación del ADN	171

3. Resultados y discusión	173
CAPÍTULO III: Determinación rápida de resistencia a colistina en cepas clínicas de <i>Acinetobacter baumannii</i> a través del uso del test Micromax	
Micromax	181
1. Introducción	184
2. Material y métodos	187
2.1. Cepas bacterianas	187
2.2. Evaluación del daño en el ADN y la pared celular ..	188
2.3. Análisis estadístico	191
3. Resultados y discusión	191
CAPÍTULO IV: Detección rápida de resistencia a antibióticos en bacterias Gram-negativas a través de la evaluación de cambios en la morfología celular	
1. Introducción	206
2. Material y métodos	208
2.1. Cepas bacterianas y determinación de la concentración mínima inhibitoria	208
2.2. Ensayo de elongación celular	208
2.3. Determinación de resistencias mediante la elongación celular	209
3. Resultados	210
4. Discusión	215
CAPÍTULO V: Evaluación rápida de resistencia a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas en los patógenos Gram-positivos <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i> , basada en la evaluación de la respuesta lítica	
	219

1. Introducción	222
2. Material y métodos	223
2.1. Cepas bacterianas	223
2.2. Ensayo de lisis	224
3. Resultados	225
4. Discusión	231

CAPÍTULO VI: Detección rápida y sencilla de resistencia a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas en patógenos Gram-negativos mediante la evaluación del alargamiento celular inducido por mitomicina C	235
---	-----

1. Introducción	238
2. Material y métodos	240
2.1. Cepas bacterianas y determinación de la concentración mínima inhibitoria	240
2.2. Inducción de la elongación celular	241
2.3. Determinación de resistencias mediante la elongación celular	242
2.4. Análisis de datos	243
3. Resultados	244
3.1. Elongación bacteriana inducida por MMC	244
3.2. Determinación de resistencias empleando la elongación celular	246
3.3. Ensayo de validación	251
4. Discusión	253

CONCLUSIONES	259
--------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	267
--------------------	-----

Abreviaturas

2-DOS: 2-desoxiestreptamina

A. baumannii: *Acinetobacter baumannii*

aa-ARNt: ARNt aminoacetilado

AACs: aminoglucósido N-acetil transferasas

ABC: transportadores dependientes de ATP (*ATP binding cassette*)

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANTs: aminoglucósido O-nucleotidil transferasas

APHs: aminoglucósido O-fosfottransferasas

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: ácido ribonucleico transferente

AST: test de sensibilidad antimicrobiana (*antimicrobial susceptibility testing*)

ATCC: Colección de Cultivos Tipo Americana (*American Type Culture Collection*)

ATP: adenosín trifosfato.

AUC: área bajo la curva (*area under the curve*)

BLEEs: β -lactamasas de espectro extendido

CARMEN: reacciones combinatorias dispuestas para la evaluación multiplexada de ácidos nucleicos (*Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleid acids*)

CHUAC: Complejo Hospitalario Universitario A Coruña

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CMI: concentración mínima inhibitoria

Complejo ACB: Complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

Cr-KPN: *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos (*carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae*)

Da: dalton

DAEC: *Escherichia coli* difusamente adherente (*diffusely adherent Escherichia coli*)

D-ala-D-ala: D-alanil-D-alanina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

ds: desviación estándar

DSB: rotura de doble cadena (*double-strand break*)

E. coli: *Escherichia coli*

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa (*enteroaggregative Escherichia coli*)

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EF: factor de elongación (*elongation factor*)

EF-Tu: factor de elongación termoinestable (*elongation factor thermo unstable*)

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica (*enterohemorrhagic Escherichia coli*)

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva (*enteroinvasive Escherichia coli*)

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogénica (*enteropathogenic Escherichia coli*)

EPS: sustancia polimérica extracelular (*extracelular polymeric substance*)

ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica (*enterotoxigenic Escherichia coli*)

Etest: Épsilon test

EUCAST: Comité Europeo de Evaluación de la Sensibilidad Antimicrobiana (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

ExPEC: *Escherichia coli* patogénica extraintestinal (*extraintestinal pathogenic Escherichia coli*)

FADH: flavin-adenin-dinucleótido reducido

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*)

GLASS: Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y de su Uso (*Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*)

GTP: guanosín trifosfato

h: hora

I: intermedia

IC: intervalo de confianza

IF: factor de iniciación (*initiation factor*)

IPEC: *Escherichia coli* patogénica intestinal (*intestinal pathogenic Escherichia coli*)

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*

KPC: carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)

LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle (*loop mediated isothermal amplification*)

LPS: lipopolisacaridos

LTA: ácido lipoteicoico (*lipoteichoic acid*)

M: molar

MALDI: desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

MALDI-TOF MS: desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*).

MATE: familia de expulsión de múltiples fármacos y tóxicos (*multidrug and toxic-compound extrusion*)

MBL: metalo- β -lactamasas

Mbp: millones de pares de bases o megabases

MDA: analizador de gotas en milifluido (*millifluidic droplet analyser*)

MDR: multirresistente (*multi-drug resistant*)

Me: mediana

MFS: superfamilia del facilitador principal (*major facilitator superfamily*)

M-H: medio Mueller-Hinton

min: minutos

ml: mililitros

mm: milímetros

MMC: mitomicina C

MNEC: *Escherichia coli* asociada a meningitis neonatal (*meningitis-associated Escherichia coli*)

MS: espectrómetro de masas (*mass spectrometer*)

n: número de datos

NADH: nicotinamida-adenín-dinucleótido reducida

NAG: N-acetilglucosamina

NAM: N-acetilmurámico

nm: nanómetros

-NO₂: grupo nitro

NS: no-sensible

°C: grados Celsius

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OXAs: oxacilinasas

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

PBPs: proteínas de unión a la penicilina (*penicillin-binding proteins*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PI: yoduro de propidio (*propidium iodide*)

PRAN: Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos

qnr: resistencia a quinolonas (*quinolone resistance*)

QRDR: regiones determinantes de resistencia a quinolonas (*quinolone-resistance-determining region*)

R: resistente

REP-PCR: PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (*Repetitive-element PCR*)

RF: factor de liberación (*release factor*)

RND: resistencia-nodulación-división (*resistance nodulation-division*)

ROC: curvas características operativas del receptor (*receiver operating characteristic curve*)

ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

RT-PCR: PCR a tiempo real (*real-time PCR*)

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*

S: sensible

SCD: dispersión de la cromatina espermática (*sperm chromatin dispersion*)

SePEC: *Escherichia coli* asociada a septicemia (*septicemic-associated Escherichia coli*)

SERS: espectroscopía Raman de superficie mejorada (*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*)

SMR: familia de proteínas pequeñas de resistencia a múltiples fármacos (*small multidrug resistance*)

SSB: rotura de cadena sencilla (*single-strand break*)

TBE: Tris borato EDTA

TLE: trión-X-100 – lisozima – EDTA

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UFC/ml: unidades formadoras de colonias/mililitro

UPEC: *Escherichia coli* uropatogénica (*uropathogenic Escherichia coli*)

VAP: neumonía asociada a ventilación (*ventilator-associated pneumonia*)

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

W: vatios

WTA: ácido teicoico de la pared (*wall teichoic acid*)

σ : desviación típica

\bar{x} : media

%: tanto por ciento

μg : microgramos

μl: microlitros

μm: micrómetros

Introducción

1. Microorganismos de alta patogenicidad.

Las resistencias antimicrobianas son un grave problema de salud a nivel global. La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en febrero de 2017 la primera lista de los denominados patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos. En ella se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. El grupo de prioridad crítica lo constituyen bacterias multirresistentes que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones en el torrente sanguíneo y neumonías. Entre ellas destacan: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos.

1.1. *Acinetobacter baumannii*

El género *Acinetobacter* incluye a cocobacilos pleomórficos Gram-negativos, aerobios estrictos, no fermentadores de la glucosa, inmóviles, no-exigentes, catalasa-positivos y oxidasa-negativos (1). *Acinetobacter* produce colonias mucosas, lisas, blanco-grisáceas cuando se cultiva a 37 °C en los medios sólidos utilizados de manera rutinaria para diagnóstico (2).

Este género ha experimentado muchos cambios taxonómicos a lo largo de los años. Uno de los principales fue la designación de la especie *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) en 1986 (3). En 2019, Vijayakumar *et al.* publicaron una revisión indicando que este género se encuentra formado por 59 especies (4). Entre ellas, cabe destacar el complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (complejo

ACB) formado inicialmente por cuatro especies (5) y al que de manera reciente se han añadido otras tres nuevas, dos causantes de enfermedades y una tercera ambiental no patógena (6, 7).

La formación de biopelículas tiene una gran importancia en las infecciones generadas por *A. baumannii*. Le permite no solo generar poblaciones robustas en tejidos vivos, sino también colonizar superficies abióticas, como equipamiento médico, incluyendo el fabricado con acero inoxidable (8, 9). *A. baumannii* tiene la capacidad de persistir en superficies deshidratadas durante periodos largos, incluso cien días en el caso de determinadas cepas (10-12). Aunque no está completamente definido (13), se sabe que su mecanismo de resistencia a la desecación es multifactorial, relacionándose con la cubierta de polisacáridos de la cápsula (14) y la composición de la membrana externa (15). Esta habilidad para tolerar el estrés ambiental, junto con la resistencia a múltiples clases de antibióticos, lo convierten en un patógeno oportunista con una gran capacidad para la propagación y persistencia, causando una gran variedad de enfermedades, afectando de manera preferencial a pacientes hospitalizados con un sistema inmune debilitado (2, 16). Pese a ello, más del 40% de los individuos adultos sanos presentan colonización por *A. baumannii* en piel y mucosas sin desarrollar patologías asociadas (17).

Las enfermedades más comunes causadas por *A. baumannii* son la neumonía asociada a ventilación mecánica (VAP) y las infecciones sanguíneas asociadas a un catéter central (18-20). En Estados Unidos y Europa, entre el 8 y el 14% de las VAP son debidas a este microorganismo, pero sus ratios son muy superiores en áreas como

Asia, América Latina y algunos países del Medio Oriente, pudiendo superar incluso el 50% (21). Una investigación llevada a cabo en 2019 revela que la tasa de incidencia de *A. baumannii* multirresistente es de 315,4 por cada 1.000 días-paciente en UCI, con una tasa de mortalidad que varía del 52 al 66% en lo que atañe a enfermedades respiratorias (22). En el caso de infecciones del torrente sanguíneo, la tasa de mortalidad debida a este patógeno se acerca al 40% (23).

Con una menor incidencia, ocasiona infecciones en tejidos blandos, piel, heridas quirúrgicas, sistema nervioso central, huesos y tracto urinario (2, 19, 24–28). *A. baumannii* ha sido aislado repetidas veces de piel y tejidos blandos de pacientes con quemaduras, heridas o traumatismos graves, por ejemplo, soldados heridos durante maniobras militares o víctimas de desastres naturales (29). Recientemente se ha afirmado que una de cada cinco cepas aisladas de este microorganismo, proviene de regiones del tracto urinario, por lo que está ganando peso como causante de infecciones en esta área (30). Además, la meningitis nosocomial causada por *A. baumannii* sigue siendo una amenaza creciente en las UCIs de neurocirugía, con una mortalidad cercana al 70%, especialmente en pacientes con tubos de ventriculostomía permanentes o fístulas cerebrospinales y que reciben terapia antimicrobiana posquirúrgica (29).

Además de las enfermedades nosocomiales, la frecuencia de enfermedades adquiridas en la comunidad causadas por este microorganismo está aumentando gradualmente (1). Mediante análisis genotípicos y fenotípicos se han identificado varios factores de virulencia importantes para la patogenicidad de *A. baumannii*. Entre ellos se incluyen: porinas, fosfolipasas, proteasas, lipopolisacáridos,

sistemas de secreción de proteínas y sistemas quelantes del hierro (1, 12, 16, 28, 31).

La terapia de primera línea para este cocobacilo son los antibióticos carbapenémicos, como imipenem, meropenem o doripenem (32–34). La aparición de resistencias, ha propiciado el uso de colistina, polimixina B, tetraciclinas o inhibidores de la β -lactamasa como el sulbactam, entre otros (35–39).

La tasa mundial de cepas de *A. baumannii* resistentes a múltiples fármacos aumenta de forma alarmante, e incluso están surgiendo panresistencias (40, 41). La OMS ha declarado que este patógeno es uno de los microorganismos más severos dentro del grupo de los acuñados como organismos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*) capaces de escapar de multitud de antibacterianos (42). Los principales mecanismos de resistencia que utiliza son: la degradación enzimática de los compuestos, modificaciones en las dianas terapéuticas, bombas de expulsión y alteraciones de la permeabilidad de la membrana (1, 17, 29, 43, 44).

1.2. *Escherichia coli*

El género *Escherichia*, que debe su nombre al pediatra alemán Theodor Escherich (45), consta de bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. El término *Escherichia coli* (*E. coli*) fue acuñado de manera definitiva en 1954 (46) para referirse a un microorganismo no exigente, oxidasa negativo, catalasa positivo, con una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C

y que puede ser móvil por flagelos peritricos (47, 48). Posee la capacidad de crecer rápidamente bajo condiciones óptimas, dividiéndose cada 20 minutos (49).

E. coli es una de las bacterias más estudiadas. Se utiliza mediante manipulación génica para la obtención de enzimas y otros productos industriales. Además, se emplea también como biomarcador de calidad de aguas, siendo su crecimiento a ciertos niveles un indicador de contaminación fecal (49).

E. coli coloniza el tracto gastro-intestinal humano a las pocas horas del nacimiento, dando lugar a un comensalismo saludable que permanece durante décadas. Estas cepas normalmente no causan enfermedades, salvo en hospedadores inmunocomprometidos, donde la bacteria puede superar las barreras, produciendo peritonitis (50). Pese a su valor positivo, hay varios clones que han desarrollado capacidad patogénica, causando una variedad de enfermedades humanas, que dan lugar a más de dos millones de muertes cada año (50, 51). La mayoría de ellas se deben a enfermedades intestinales, fundamentalmente diarreas que afectan a niños menores de 5 años; pero también existen cepas patógenas denominadas *E. coli* extraintestinales, que generan infecciones del tracto urinario, del torrente sanguíneo y del sistema nervioso central (50, 52).

Los factores de virulencia que utilizan estas cepas están codificados por genes presentes en elementos genéticos móviles extragenómicos, incluidos en el genoma, o combinaciones de ambos. Sólo aquellas combinaciones más exitosas han permanecido y dado lugar a los denominados “patotipos” (50). Dependiendo de las

regiones corporales a las que afecten, podremos hablar de *E. coli* patogénicas intestinales (IPEC) y extraintestinales (ExPEC). Las IPEC se dividen a su vez en 6 patotipos: enteropatógenicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroagregativas (EAEC), enteroinvasivas (EIEC) y difusamente adherentes (DAEC) (47, 50, 53, 54). Las bacterias del patotipo enteropatógeno están asociadas con diarreas infantiles en países en vía de desarrollo, produciendo una histopatología muy característica en las células epiteliales del intestino. En EHEC, la misma histopatología suele estar acompañada de la producción de la citotoxina Shiga, y en muchos casos las diarreas van acompañadas de sangrados. ETEC es la principal causa de la diarrea del viajero en individuos de países industrializados cuando viajan a países subdesarrollados. EIEC es muy similar a *Shigella*, causando diarrea y disentería a través de un complicado mecanismo de patogénesis que comienza con la invasión de las células epiteliales y posterior diseminación a los tejidos adyacentes. EAEC causa diarreas persistentes tanto en adultos como en niños de países desarrollados. DAEC se definieron inicialmente por un patrón difuso característico de adherencia en células epiteliales cultivadas y que está vinculado al desarrollo de diarrea en niños mayores (50).

Cuando hablamos de ExPEC estamos englobando: *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* asociada a meningitis neonatal (MNEC) y *E. coli* asociada a septicemia (SePEC) (47, 50, 53, 54). Las infecciones causadas por UPEC representan más del 85% de los casos de cistitis aguda y más del 60% de los casos de cistitis recurrentes. Las infecciones de este tipo que no cesan tras profilaxis antibiótica, pueden conducir a

pielonefritis, sepsis o incluso la muerte (55). MNEC es la causa más común de meningitis vinculada a Gram-negativos en neonatos (50). *E. coli* es una de las principales causas de bacteriemia en todo el mundo. La incidencia anual general de bacteriemia por este microorganismo en adultos aumenta notablemente con la edad, llegando a 452 casos por cada 100.000 personas-año en individuos con edad superior a los 85 años (55).

E. coli suele vivir en el intestino de animales de sangre caliente, y por ello, se encuentra expuesta de manera reiterada a antibióticos, lo que genera una presión selectiva que conduce a la resistencia contra los antimicrobianos consumidos por su huésped (56). Este es uno de los factores que hace que este microorganismo, pese a no formar parte del grupo ESKAPE, esté fuertemente vinculado a este gran problema de salud a nivel mundial.

1.3. *Enterococcus faecalis*

Los enterococos son organismos Gram-positivos, con relativamente bajo contenido en guanina y citosina, de forma esférica u oval, que pueden formar parejas o cadenas de diversa longitud. Su tamaño es de 0,6-2,0 x 0,6 x 2,5 μm . No son formadores de esporas y la mayoría no son móviles. Las bacterias del género *Enterococcus* son anaerobias facultativas, quimiotrofas, catalasa negativas y fermentadoras. Fermentan un amplio rango de carbohidratos, produciendo principalmente ácido láctico. Crecen de manera óptima a 35 °C, pero pueden tolerar temperaturas entre los 10 y los 45 °C (57). Se encuentran en alimentos fermentados, en el medio natural (plantas, suelos, agua), y en el tracto gastrointestinal de animales, incluyendo,

mamíferos, reptiles, aves e insectos (58–60). Su amplia distribución se debe a la capacidad de sobrevivir y persistir en gran variedad de condiciones osmóticas, de pH y temperatura (59).

En 1970, Kalina reclasificó a *Enterococcus* como género independiente (61). De las 54 especies que lo constituyen (62), *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, son las más frecuentes (63).

Pese a que en humanos son parte de la flora intestinal habitual, pueden causar infecciones oportunistas. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) es el responsable de entre el 80 y el 90% de las enfermedades nosocomiales asociadas a su género y el tercer patógeno más frecuente aislado en el ambiente hospitalario (64, 65). Causa bacteriemia, endocarditis e infecciones del tracto urinario (66–70). Además, se ha encontrado en las regiones periodontales de entre el 1% y el 51,8% de pacientes con periodontitis crónica (71–73).

Se estima que el 25% de su genoma se corresponde con elementos adquiridos, incluyendo genes de resistencia antibiótica (74). Este mecanismo junto con la modificación de dianas antimicrobianas, inactivación mediante enzimas hidrolíticas, sobreexpresión de bombas de expulsión y respuestas adaptativas, como la formación de biopelículas, hace que muestre resistencia habitual a gran variedad de antibióticos como los aminoglucósidos y los β -lactámicos (63, 75–78).

1.4. *Klebsiella pneumoniae*

Este Gram-negativo, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo anaerobio facultativo, fermentador de la lactosa, inmóvil. En

su mayoría son portadores de una cápsula de polisacáridos y pueden formar colonias mucosas fácilmente reconocibles. El genoma típico de esta especie tiene un tamaño comprendido entre los 5 y los 6 Mpb, conteniendo entre 5.000 y 6.000 genes (79).

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) puede sobrevivir en multitud de nichos ecológicos, tanto de forma libre como asociada a huéspedes. Estos nichos incluyen: suelo, agua, varias especies vegetales, insectos, aves, reptiles y muchos mamíferos (80).

La relación entre este microorganismo y los humanos es compleja y variable, ya que puede adoptar el papel de comensal, de patógeno o de patógeno oportunista (81). La colonización comensal en el intestino y en el tracto respiratorio es común, pero varía en función de la edad, la disposición geográfica y la atención hospitalaria previa. La mayoría de las infecciones que causa son oportunistas por diseminación a boca, piel y aparato urinario, además de estar presente en el ámbito hospitalario y el aparataje médico. Afecta fundamentalmente a neonatos y pacientes que se encuentran con el sistema inmune comprometido o que padecen algún otro tipo de patología previa (81-83). Está involucrado en infecciones del tracto urinario, cistitis, neumonía, heridas quirúrgicas, y enfermedades potencialmente mortales como la endocarditis o la septicemia (84-86). Fuera del ambiente hospitalario se comporta como un patógeno real, afectando a población sana y sin factores de riesgo, causando endoftalmitis, neumonía, fascitis necrotizante, meningitis y patologías del tracto digestivo (87, 88).

Las infecciones nosocomiales causadas por *K. pneumoniae* tienden a ser crónicas, debido fundamentalmente a dos motivos, uno, el hecho de

que las biopelículas que forma protegen al patógeno de los ataques del sistema inmune y los antibióticos (89), y otro, la existencia de fenotipos multirresistentes debidos a la presencia de carbapenemasas y β -lactamasas, complicando la elección de un tratamiento antibiótico adecuado (90, 91).

Las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem (Cr-KPN) emplean dos mecanismos: la producción de β -lactamasas con capacidad de hidrolizar cefalosporinas, en combinación con la disminución de la permeabilidad de la pared celular (92) o la producción de β -lactamasas que degradan la mayoría de los antibióticos β -lactámicos. Según la clasificación Ambler, las β -lactamasas que expresa pertenecen a la clase A (*K. pneumoniae* carbapenemasa KPC), clase B o metalo- β -lactamasas (MBL) y clase D (OXA-48-like carbapenemasas) (93).

La capacidad para desarrollar resistencias, produciendo infecciones invasivas con alta mortalidad, la ha convertido en una seria amenaza para la salud humana (85, 91, 94, 95).

1.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es el miembro más conocido del género *Pseudomonas*. Se trata de un bacilo recto o levemente curvado, Gram-negativo, con un tamaño de 2-4 x 0,5-1 μm y móvil gracias a la presencia de un flagelo polar.

En relación a su metabolismo, es aerobio (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias utilizando nitrato), catalasa y oxidasa positivo. Su genoma es de gran tamaño, alcanzando entre los 5 y los 7 Mpb y codifica enzimas reguladoras importantes para el

metabolismo, el transporte y la expulsión de compuestos orgánicos (96, 97). Posee una membrana citoplasmática con una bicapa fosfolipídica simétrica y una membrana externa asimétrica con fosfolípidos en su lado interno y lipopolisacáridos en el externo, que generan una barrera de permeabilidad (98).

Se caracteriza por producir variedad de pigmentos, como la piocianina (de color azul verdoso), la pioverdina (pigmento fluorescente verde amarillento) y la piorrubina (roja) que dan lugar a distintas tonalidades en el cultivo.

Este patógeno oportunista habita normalmente el suelo y las superficies de ambientes acuosos. Su capacidad de adaptación junto con la elevada resistencia antibiótica intrínseca, le permite sobrevivir en gran cantidad de espacios tanto naturales como artificiales, tales como las instalaciones médicas (96, 99-101).

Es un importante patógeno nosocomial, que causa diversas infecciones agudas o crónicas, que se propaga por el tracto respiratorio, urinario, gastrointestinal, las heridas y el torrente sanguíneo (102-104). Dada la amplia distribución de este microorganismo, es comprensible que el sistema inmune sea habitualmente capaz de controlar la infección. Sin embargo, los individuos sensibles, principalmente aquellos afectados por VIH, fibrosis quística, receptores de trasplantes de órganos o pacientes quemados con daño vascular, sufren con frecuencia infecciones causadas por este patógeno (105-110). En el caso de individuos con fibrosis quística, las infecciones respiratorias crónicas incrementan la mortalidad y la morbilidad en gran medida (111, 112).

La capacidad de daño de esta bacteria se debe en buena parte a la producción de factores de virulencia como elastasa, proteasa alcalina, piocianina y biopelículas, lo que le proporciona la capacidad de degradar proteínas del sistema inmune (113), romper la laminina de la matriz proteica extracelular, incrementar el estrés oxidativo del hospedador (114) y demorar la entrada de los antibióticos (115).

Las opciones terapéuticas son cada vez más limitadas debido a la continua emergencia y diseminación de cepas resistentes a antibióticos (99). Muchos medicamentos antimicrobianos se mantienen fuera de las células. Inicialmente se atribuyó este fenómeno a la impermeabilidad celular, pero más tarde se vio que esta iba acompañada por una amplia gama de sistemas de bombeo que impiden la permanencia del antibiótico en el interior celular (116). Además, *P. aeruginosa* posee una gran capacidad de adquirir genes de resistencia a través de elementos móviles tales como plásmidos o trasposones, o cambiar la expresión de los genes cromosómicos (117, 118). Se consideran cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes (MDR) las resistentes a dos o más de los siguientes grupos de antibióticos: aminoglucósidos, fluoroquinolonas y β -lactámicos (119, 120) convirtiéndose en un gran problema para la salud pública. Tanto es así, que además de formar parte del grupo ESKAPE, la OMS ha tildado a *P. aeruginosa* resistente a carbapenem como una de las tres especies en las que es más crítico el desarrollo de nuevos antibióticos para tratar sus infecciones (121).

1.6. *Streptococcus pneumoniae*

Esta bacteria recibe comúnmente el nombre de neumococo. Fue aislada por primera vez a partir de saliva en 1881, de manera independiente por Pasteur y Sternberg (122, 123).

Se trata de un Gram-positivo con una longitud de entre 1,2 y 1,8 μm , que presenta forma oval con el extremo distal lanceolado. Es inmóvil, no forma esporas y es un miembro alfa-hemolítico del género *Streptococcus*. Es un anaerobio facultativo que fermenta distintas fuentes de carbono para dar lugar a ácido láctico (124). Produce altos niveles de peróxido de hidrógeno. Por ello se suele incluir sangre en el medio de cultivo, que aporta catalasa, la cual descompone el peróxido de hidrógeno.

Generalmente se presenta en forma de diplococo, por lo que inicialmente fue denominado *Diplococcus pneumoniae*, aunque existen algunos factores que pueden inducir la formación de cadenas (125). Hay identificados y caracterizados por lo menos 98 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) que son reconocidos de manera independiente por el hospedador. Estos serotipos dependen de la composición de la cápsula de polisacáridos que rodea al microorganismo (123, 126–130). Siendo una bacteria Gram-positiva, su pared celular posee múltiples capas de peptidoglicano. Además, contiene ácidos teicoicos unidos al peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos unidos a la membrana citoplasmática localizada debajo del peptidoglicano. Ambos ácidos poseen residuos de fosforilcolina, que son claves para la unión a receptores de colina localizados en las células humanas (131).

S. pneumoniae posee una característica capacidad de autodesintegración, debido a la presencia de la autolisina LytA. Esto suele acontecer cuando la población alcanza la fase estacionaria o cuando se ve afectada por antibióticos que inhiben la síntesis del peptidoglicano. La incubación con sales biliares u otros detergentes, activa la autolisina, provocando la respuesta autolítica en pocos minutos, por lo que puede ser utilizada para su identificación (132, 133).

Este microorganismo ocupa de manera asintomática la región nasofaríngea de los humanos. Esta relación comensal es más frecuente en la infancia (27-65% de portadores) que en la edad adulta (menos del 10%) (134). Su posición en la parte superior del tracto respiratorio le proporciona una ventaja para diseminarse entre la población (135-137). Se puede transmitir mediante gotas respiratorias a través del aire o por contacto directo con secreciones de los portadores. Cuando llega a un nuevo hospedador, dependiendo de varios factores como el estado inmunológico, puede adherirse al epitelio respiratorio y formar parte de la microbiota o desencadenar patologías (138). *S. pneumoniae* sigue siendo la causa más frecuente de neumonías adquiridas en la comunidad a pesar de la diseminación del uso de vacunas (139). Además, también puede causar: sinusitis paranasal, otitis media, meningitis, conjuntivitis, osteomielitis y bacteriemia, entre otras infecciones (135, 138, 140-143). Las enfermedades causadas por neumococo son más prevalentes en niños pequeños, adultos mayores y personas con comorbilidades subyacentes (125, 144-148).

En 2017 la OMS incluyó a *S. pneumoniae* como uno de los 12 patógenos prioritarios, debido a su elevada morbilidad y mortalidad

(131). Entre el 15 y el 30% de las cepas de neumococo son clasificadas como multirresistentes (149). Durante las décadas de los 80 y los 90 desarrolló resistencia a la penicilina, lo que llevó a que se combatiese con macrólidos. Sin embargo, el amplio uso de estos antibióticos ha generado una presión selectiva que contribuye a la expansión de las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a macrólidos (150, 151). Pese a esta situación, las terapias antibióticas más recomendadas frente a neumococo incluyen: β -lactámicos (cefotaxima), macrólidos (azitromicina) o fluoroquinolonas (moxifloxacino) solos, o en combinación (152).

2. Mecanismos de acción de los antibióticos

Los antibióticos son un subgrupo de antimicrobianos, formados por moléculas naturales, sintéticas o semisintéticas, capaces de inducir la muerte (acción bactericida) o la detención del crecimiento de bacterias (acción bacteriostática). Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejerciendo una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo. Poseen una elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y su toxicidad es selectiva, ya que bloquean una enzima o un sustrato no presente en las células humanas o suficientemente distinto (153).

Según el mecanismo de acción de los antibióticos estos se pueden clasificar en cinco grupos: inhibidores de la replicación del ADN, inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la

síntesis proteica, inhibidores de la membrana citoplasmática e inhibidores de vías metabólicas (figura 1).

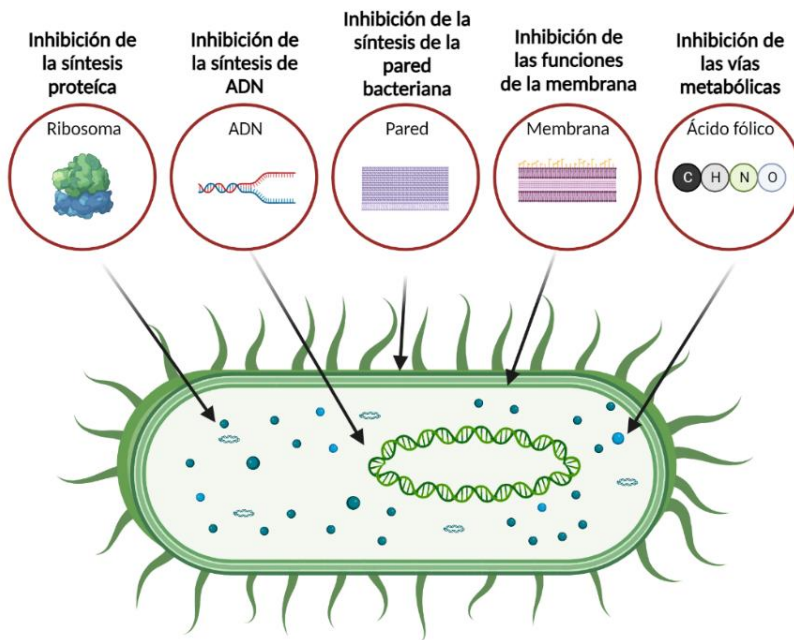


Figura 1. Tipos de antibióticos atendiendo a su mecanismo de acción. Imagen creada en BioRender.

2.1. Antibióticos que actúan en el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos

El genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir del molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formará parte de los ribosomas bacterianos. El ADN debe duplicarse (replicación) para transmitir esta información a la descendencia. La replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, que

además del ADN molde, constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos.

Dentro de este grupo se incluyen las rifamicinas y las quinolonas, que actúan sobre enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación, y otros, que actúan directamente sobre el ADN, dañándolo, como nitroimidazoles y nitrofuranos. La mayoría de los antibióticos que actúan sobre el ADN son bactericidas rápidos y normalmente independientes del inóculo y de la fase de crecimiento bacteriano (154).

2.1.1. Quinolonas

La aparición de esta clase de antibacterianos comenzó con la síntesis del ácido nalidíxico por Leshner en 1962 (155). La modificación de la estructura de este compuesto dio lugar a la segunda generación de quinolonas, permitiendo la síntesis de la primera fluoroquinolona: el norfloxacin (156). Sucesivas modificaciones en la molécula de la fluoroquinolona dieron lugar al ciprofloxacino en los años ochenta (157). El ciprofloxacino es un antibiótico de amplio espectro, que mantiene la potente actividad contra Gram-negativos que tenían los compuestos previos, pero mejora la actividad sobre algunos Gram-positivos. Posteriormente se han realizado intentos para modificar la molécula de fluoroquinolona y superar las limitaciones del ciprofloxacino, diseñándose las quinolonas de tercera generación como el levofloxacino, que actúa sobre microorganismos como *S. pneumoniae*. Las modificaciones llevadas a cabo para ser efectivos también contra bacterias anaerobias, dieron lugar a las quinolonas de

cuarta generación, cuyo miembro más conocido es el moxifloxacin (158, 159) (figura 2).

Entre las características comunes de las fluoroquinolonas se incluyen: la retención del nitrógeno en N-1, el ácido carboxílico en C-3, la cetona en C-4 y el átomo de flúor en C-6, siendo todos ellos de demostrada importancia para el mantenimiento de la potente actividad antibacteriana (160). El desarrollo de las nuevas fluoroquinolonas se ha desencadenado como consecuencia de numerosas modificaciones de los sustituyentes en las posiciones 1, 5, 7 y 8 (161).

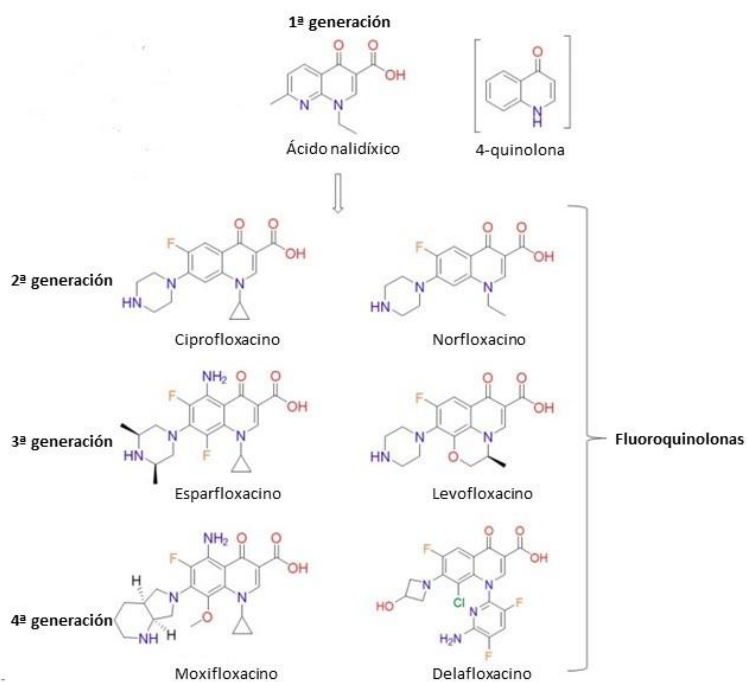


Figura 2. Estructura química de varias de la fluoroquinolonas más importantes. (Modificado de (162)).

Los fluoroquinolonas se unen a dianas específicas en el ADN bacteriano (163, 164) y, por lo tanto, la acumulación intracelular de estas moléculas es esencial para poder llevar a cabo su actividad. Se ha visto que su incorporación se lleva a cabo por difusión simple a través de la membrana celular en *E. coli* y *S. aureus* (165), con cierta captación por parte de la vía de las porinas en la membrana externa de Gram-negativos (166). Una vez en el interior de la célula, su acción se debe a la inhibición de dos enzimas topoisomerasas de tipo II: la ADN girasa y la topoisomerasa IV (163, 167-169). Las topoisomerasas son esenciales para el control del estado topológico del ADN, ya que se encargan de gestionar los superenrollamientos, la relajación, cortes y uniones, que resultan vitales para los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación (169-172).

La ADN girasa es una proteína tetramérica compuesta por dos subunidades A y dos subunidades B (A_2B_2) (166). La subunidad A (GyrA), codificada por el gen *gyrA* se encarga del enrollamiento del ADN, la realización de cortes de la doble cadena del ADN y su posterior sellado. Después de esta unión, las subunidades B (GyrB), codificadas por *gyrB*, son las responsables de la hidrólisis de ATP y la interacción con GyrA y el ATP. La ADN girasa introduce superenrollamientos negativos en las cadenas de ADN y libera la tensión torsional acumulada por los procesos de replicación y transcripción (173, 174).

La topoisomerasa IV está formada por dos subunidades ParC y dos ParE ($ParC_2ParE_2$), codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente (169). Esta enzima presenta una potente actividad decatenante. Ambas enzimas juegan un papel esencial en la

segregación del ADN cromosómico replicado durante la división celular (169, 175) y en las reacciones de relajación y separación del ADN (163, 169, 170).

Las quinolonas inhiben la acción de estas enzimas, uniéndose al ADN roto y a la topoisomerasa formando un complejo ternario quinolona-ADN-topoisomerasa, de forma irreversible (figura 3). Estos complejos impiden que el proceso de transcripción o replicación continúen, bloqueando así el crecimiento, pero no conducen a la muerte celular. Tras la inducción de la rotura de la doble cadena por parte de la topoisomerasa, la quinolona bloquea su reparación. Esto ocurre de manera esporádica por todo el cromosoma bacteriano, que se fragmenta masivamente. Es este proceso el que se relaciona directamente con la muerte celular (161, 163, 166, 173, 176-178).

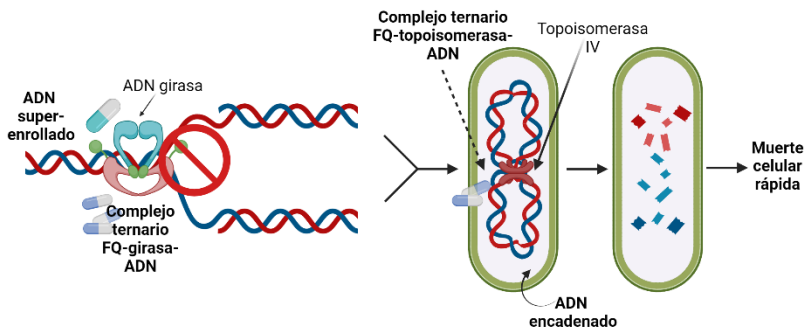


Figura 3. Mecanismo de acción de las quinolonas. Para relajar el ADN superenrollado y permitir que el ADN pueda ser procesado, las topoisomerasas introducen cortes en la molécula. La formación del complejo ADN-Topoisomerasa-Quinolona inhibe la replicación del ADN e impide que los cortes en la doble hélice sean resellados, y el cromosoma se fragmenta; ambas situaciones pueden conducir a la muerte celular. (Figura creada con BioRender).

En el caso de la mayoría de las especies de Gram-negativos, la girasa es la diana preferencial de la quinolona y la topoisomerasa IV la secundaria (163, 168, 179), mientras que en el caso de los Gram-positivos ocurre al revés (180-185).

2.1.2. Rifamicinas

Las rifamicinas son un grupo de antibióticos antiguos que poseen actividad antimicrobiana contra Gram-positivos y Gram-negativos. Dentro de los más destacados están la rifampicina y la rifapentina para tratar la tuberculosis, la rifabutina empleada frente a infecciones provocadas por *Mycobacterium avium*, y la rifaximina administrada a pacientes con diarrea del viajero (186).

El mecanismo de acción de las rifamicinas se basa en la interferencia de la síntesis del ARN y tienen como diana preferencial, la ARN polimerasa. Se fijan a la subunidad beta de esta enzima, codificada por el gen *rpoB* (187) bloqueando la elongación del ARNm cuando alcanza 2 ó 3 nucleótidos. No son efectivas en pasos más avanzados del proceso. Esta acción es específica sobre la ARN polimerasa bacteriana, ya que no se ha detectado inhibición de la proteína en el caso de humanos (186).

2.1.3. Nitrofuranos y nitroimidazoles

Los nitroimidazoles y los nitrofuranos son dos grupos de quimioterápicos de origen sintético que tienen efecto antibacteriano y/o antiparasitario por degradación del ADN. Ambos grupos tienen cierta similitud estructural y en ambos la reducción del grupo nitro

(- NO₂) parece ser necesaria para que se produzca el efecto bactericida o parasiticida (188, 189).

El 5-nitrofurano y sus derivados se han administrado en la práctica clínica desde los años sesenta, para tratar una gran variedad de enfermedades que van desde infecciones del tracto urinario hasta el cáncer (189). Los nitroimidazoles penetran fácilmente en el citoplasma por difusión pasiva. El grupo NO₂ del anillo imidazólico, que se comporta como aceptor de electrones, se reduce por nitrorreductasas, liberándose nitritos que dañan el ADN por oxidación. Los nitrofuranos actúan de manera similar, generando sustancias tóxicas en el citoplasma que dañan el ADN (154).

2.2. Antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana

La pared celular es la encargada de mantener la forma de la bacteria, ofreciendo resistencia al estrés mecánico y a la presión osmótica interna. El peptidoglicano o mureína es un componente importante de la pared celular bacteriana (figura 4). Forma una enorme red de cadenas interconectadas de subunidades alternas de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM). Los péptidos de cadena corta, que se unen a NAM lo hacen de manera reticular a las ramas peptídicas de las cadenas de muropéptido cercanas. Los componentes del peptidoglicano son sintetizados y ensamblados en el citoplasma y transferidos a la cara externa de la membrana citoplasmática.

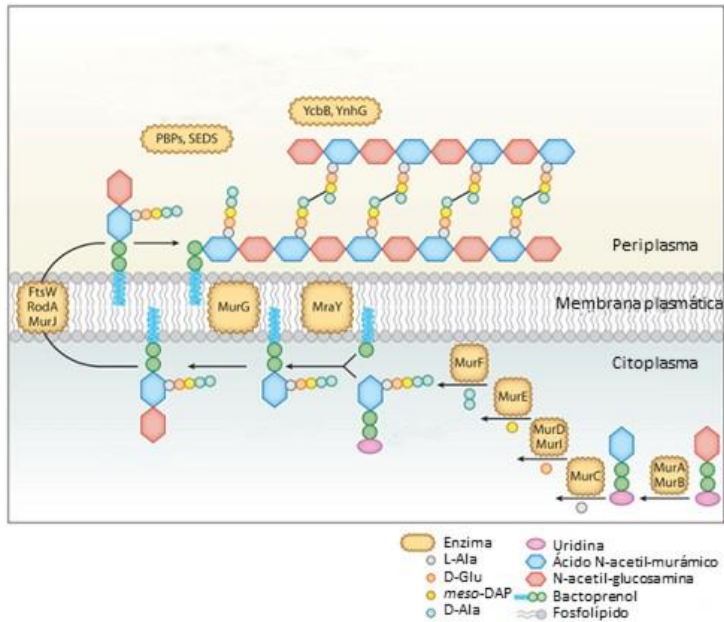


Figura 4. Ruta de la biosíntesis del peptidoglicano en *E. coli*. No se muestran algunos componentes de la pared celular (ej: membrana externa) para simplificar la interpretación. La vía de síntesis comienza con la formación del nucleótido de Park en el citoplasma, seguida de la unión a un componente lipídico para producir el lípido II. Finalmente, el lípido II es trasladado a través de la membrana citoplasmática y luego insertado en el pépidoglicano existente mediante reacciones de transglucosilación y transpeptidación (190).

Allí, las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) o DD-peptidasas catalizan la formación de enlaces glucosídicos entre dos unidades de muropéptidos generando cadenas lineales glucídicas y la formación de enlaces peptídicos entre cadenas adyacentes de mureína, es decir, la transpeptidación, dando lugar a un polímero rígido tridimensional (191–193). Mientras que las bacterias Gram-negativas contienen de dos a cinco capas de peptidoglicano, las Gram-positivas portan una pared celular mucho más gruesa, con ácidos teicoicos adheridos al peptidoglicano y a la membrana citoplasmática (figura 5). Además, hay variabilidad entre diferentes especies

y cepas, tanto en la frecuencia de entrecruzamientos en el peptidoglicano como en la presencia de diferentes moléculas incorporadas en el peptidoglicano (193).

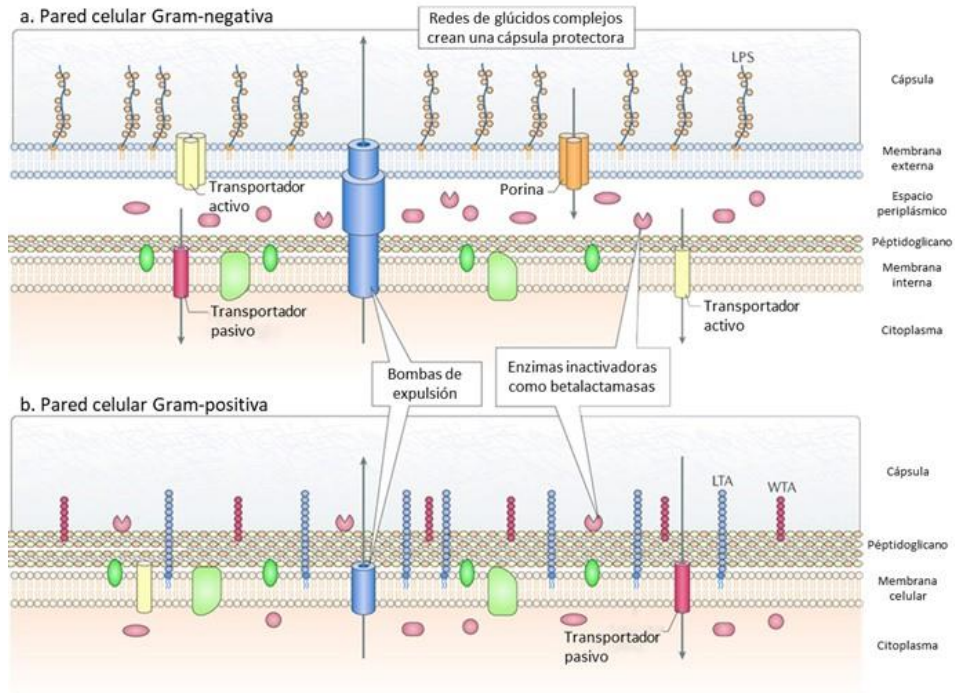


Figura 5. Paredes celulares Gram-negativa y Gram-positiva. Las bacterias Gram-positivas (**b**) suelen utilizar una gruesa capa de peptidoglicano para proteger su membrana citoplasmática, mientras que las bacterias Gram-negativas (**a**) cuentan con una membrana interna y otra externa que rodea a una matriz de peptidoglicano más fina y al espacio periplásmico. El transporte de antibióticos y otros compuestos extracelulares a través de las membranas bacterianas se produce de forma activa o pasiva, según la naturaleza del transportador. Existen numerosos componentes asociados a ambos tipos de paredes celulares que limitan la capacidad de los antibióticos para penetrar en estas estructuras, como bombas de expulsión, enzimas defensivas, como las β -lactamasas, y complejas redes de carbohidratos que crean una cubierta protectora. (LPS: lipopolisacáridos, LTA: ácido lipoteicoico, WTA: ácido teicoico de la pared) (194).

La pared bacteriana es susceptible de verse afectada por acción de los antimicrobianos. De hecho, los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular son los más ampliamente utilizados en la práctica clínica (191). Los podemos dividir en tres grandes grupos: β -lactámicos; glucopéptidos; y fosfonopéptidos, isoxazolidinonas y bacitracina.

2.2.1. β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son agentes antibacterianos de enorme relevancia. El descubrimiento y la comercialización del primer antibiótico β -lactámico (Penicilina G) es un hito simbólico de la quimioterapia moderna. Desde entonces, se han introducido otros antibióticos β -lactámicos que han revolucionado el tratamiento de las infecciones bacterianas (195).

Esta familia está constituida por fármacos bactericidas estructuralmente relacionados que contienen un anillo β -lactámico en su estructura química (figura 6). Se clasifican en: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas (196). Esta clasificación depende de la naturaleza química del anillo fusionado a la unidad farmacófora β -lactámica, generando un andamiaje bicíclico no coplanar (195).

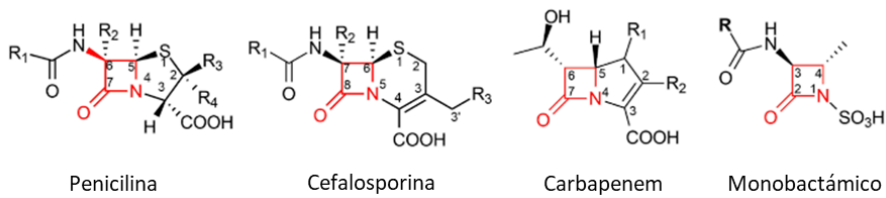


Figura 6. Estructura básica de diferentes clases de antibióticos β -lactámicos. En todos ellos se observa resaltado en rojo el anillo β -lactámico. Este se encuentra en cada caso unido a un sustituyente diferente: a un anillo de tiazolidina en el caso de las penicilinas, a un anillo de dihidrotiazina en las cefalosporinas y a un anillo de pirrolina en los carbapenems. Cuando nos referimos a los monobactámicos, la fracción β -lactámica no está fusionada a ningún otro anillo. (Modificado de (197))

Estos antibióticos son análogos de la D-alanil-D-alanina (D-ala-D-ala), el residuo aminoacídico terminal en las subunidades del precursor NAG/NAM-péptido. De este modo interactúan con el centro activo de las PBP's y reaccionan covalentemente con un residuo de serina. Principalmente inhiben la transpeptidación, de manera que detienen el crecimiento celular. Secundariamente, un aumento de precursores del peptidoglicano, desencadena que las hidrolasas de mureína o autolisinas, degraden el peptidoglicano, conduciendo a la muerte celular (198) (figura 7). En el caso de las bacterias Gram-positivas, los ácidos teicoicos que inhiben el sistema autolítico se pierden, y las hidrolasas asociadas a la mureína se activan y degradan el peptidoglicano (193).

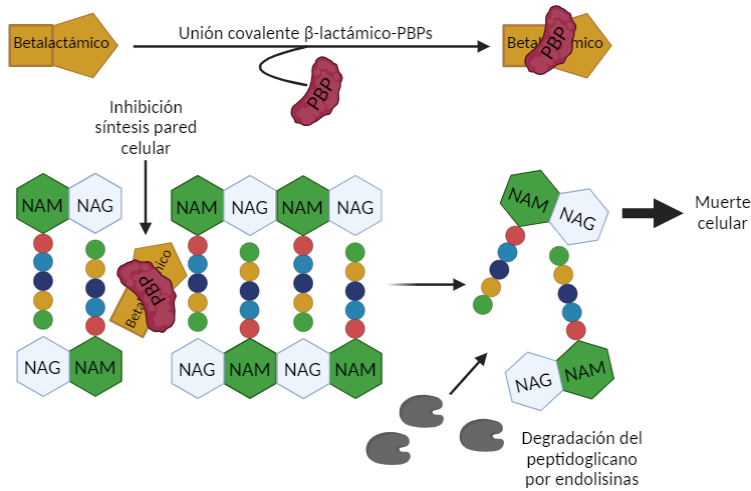


Figura 7. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos. (Creada con BioRender)

2.2.2. Glucopéptidos

Los antimicrobianos glucopéptidos son un grupo de productos naturales y péptidos glicosilados semisintéticos que poseen actividad antibacteriana contra organismos Gram-positivos mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular (199).

Estructuralmente, son heptapéptidos glicosilados. Basándose en la identidad de los aminoácidos 1 y 3 del núcleo heptapeptídico, los glucopéptidos pueden clasificarse en cinco clases, cuyos representantes principales son, respectivamente: vancomicina, actinoidina A, ristocetina A, teicoplanina y complestatina (200).

Todos ellos comparten la propiedad de unirse con una gran afinidad y especificidad al dipéptido terminal D-ala-D-ala de los precursores del peptidoglicano expuestos en la superficie externa de la membrana plasmática y, por tanto, provocan la inhibición de la

polimerización y entrecruzamiento del peptidoglicano, conduciendo en último término a la lisis celular (199).

2.2.3. Fosfonopéptidos, isoxazolidinonas y bacitracina

Otros miembros del grupo de antibióticos que afectan a la síntesis de la pared celular son: la fosfomicina, que inhibe la enzima murA afectando el primer paso de la síntesis del peptidoglicano (201, 202); la cicloserina, que es un inhibidor competitivo de la alanina-racemasa y la alanina-sintetasa, que conducen a la síntesis del dipéptido D-ala-D-ala (203); y la bacitracina, un dodecapéptido que forma complejos con el difostafo de undecaprenilo y bloquea su defosforilación (204).

2.3. Antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas

La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos. Su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S), que contiene ARN ribosómico (ARNr 16S en la subunidad 30S, y ARNr 5S y ARNr 23S en la subunidad 50S) y diversas proteínas llamadas S (small o pequeña, en la subunidad 30S) o L (large o grande, en la subunidad 50S). Los distintos antimicrobianos, utilizan diferentes lugares de unión, como pueden ser, determinados nucleótidos para las oxazolidinas, algunas proteínas S para las tetraciclinas o proteínas L para el cloranfenicol (154).

La síntesis de proteínas se puede dividir en cuatro pasos fundamentales: iniciación, elongación, terminación y reciclaje. La fase de iniciación incluye la formación del ribosoma de 70S a partir de las subunidades de 30S y 50S, y el posicionamiento del codón iniciador del ARNm (normalmente AUG) junto con el ARNt iniciador (normalmente fMet-tRNA) en sitio P del ribosoma. La eficiencia y fidelidad de este proceso es controlada por tres factores de iniciación de la transcripción especializados IF1, IF2 e IF3. La fase de elongación incluye un ciclo de cuatro pasos. Primero, un ARNt aminoacilado (aa-ARNt) se coloca en el sitio A del ribosoma por el factor de elongación Tu (EF-Tu) en un complejo con GTP. Durante el proceso de decodificación el ribosoma monitoriza la interacción de apareamiento entre el codón del ARNm y el anticodón del ARNt, asegurándose que sólo los ARNts unidos al aminoácido correcto son los que se colocan. La formación de los enlaces peptídicos ocurre entre los aminoácidos unidos a los ARNts en los sitios A y los sitios P, dando lugar a la transferencia de un aminoácido (o la cadena polipeptídica en ciclos posteriores de la elongación) del ARNt del sitio P al aa-ARNt del sitio A. Para acomodar la siguiente incorporación de aa-ARNt, los ARNts se mueven de los sitios A y P a los sitios P y E en un proceso llamado translocación, que es facilitado por el EF-G. Cuando la cadena polipeptídica se alarga, pasa a través de un túnel de salida en la subunidad 50S antes de entrar en el citoplasma, donde se pliega la proteína. El ciclo de elongación continúa hasta que se encuentra un codón de parada. Los codones de parada son reconocidos por los factores de liberación (RF1 y RF2) que hidrolizan la unión ARNt-péptido, liberando la cadena polipeptídica del ribosoma. El

complejo es posteriormente desensamblado, lo que permite que los componentes sean reciclados para la siguiente ronda de iniciación de la traslación (205).

Varias clases de antibióticos clínicamente importantes tienen como diana los ribosomas bacterianos, donde interfieren con la síntesis de proteínas bacterianas. Los estudios estructurales de la interacción de antibióticos con los ribosomas han revelado que estas pequeñas moléculas reconocen predominantemente los componentes de ARNr (206).

Se diferencian distintos tipos de antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas según su mecanismo de acción dentro del proceso (figura 8).

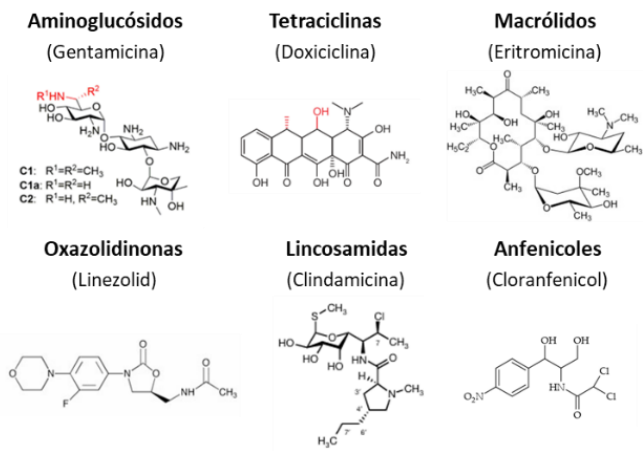


Figura 8. Estructura química de los diferentes tipos de antibióticos inhibidores de la síntesis proteica.

2.3.1. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son compuestos naturales obtenidos de actinomicetos del suelo o productos sintéticos derivados de ellos. En su estructura portan un anillo 6-carbón aminociclitol, normalmente 2-desoxiestreptamina (2-DOS) al que se unen diferentes azúcares. Basándose en su estructura se clasifican en varios grupos. Los aminoglucósidos más utilizados en la práctica clínica son: amikacina, gentamicina y tobramicina. Poseen un amplio espectro antimicrobiano incluyendo Gram-positivos y Gram-negativos, pero debido a la necesidad de utilizar el gradiente eléctrico para penetrar en la célula (207), no son eficaces en bacterias anaerobias. Los aminoglucósidos tienen un efecto bactericida dependiente de su concentración y poseen un importante efecto postantibiótico (208).

Los aminoglucósidos inhiben la síntesis proteica bacteriana por acciones pleiotrópicas que llevan a alteraciones de la traducción en diversos pasos incluidos en la iniciación, elongación y terminación. Se unen a la subunidad ribosomal 30S, específicamente al ARNr 16S y particularmente el sitio A (209). Esta unión estabiliza un apareamiento disperejo de codón y anticodón, conduciendo a una traducción errónea (figura 9). Muchos de los datos acerca del funcionamiento molecular de los aminoglucósidos fueron obtenidos de estudios sobre la estructura de los ribosomas (206, 210). Se unen a un bucle interno del ARNr de 16S que contiene 3 residuos de adenina desapareados. Dos de las adeninas (A1492 y A1493) son flexibles y pueden adoptar posiciones dentro del bucle de ARN o proyectarse hasta el sitio en el ribosoma que aloja el híbrido entre el ARNm y el ARNt unido al sitio A. La decodificación del ARNm incluye el contacto directo entre las

adeninas flexibles y el híbrido codón-anticodón del ARNm-ARNt. La unión del aminoglucósido al sitio de descodificación desplaza las adeninas flexibles del interior del ARN 16S y las bloquea en un estado que se asemeja mucho a la conformación durante la decodificación del ARNm (210, 211), conduciendo a una reducción de fidelidad en la traducción (212).

2.3.2. Tetraciclinas

El primer fármaco de la familia de las tetraciclinas, la clortetraciclina, fue descubierto en 1948 (213). La base de su estructura es una molécula de naftaceno, que comprende cuatro anillos aromáticos, lo que le da el nombre a este grupo de antibióticos. La unión de los mismos a diferentes radicales genera las distintas tetraciclinas. Tan pronto como se descubrió la primera generación de tetraciclinas, se comenzó a desarrollar la segunda, con compuestos tan representativos como la doxiciclina (214). Con la emergencia de las resistencias se recuperó el interés por el desarrollo de la tercera generación de tetraciclinas, surgiendo las glicilciclinas, como la tigeciclina. La tigeciclina es un derivado de la minociclina con un grupo t-butilamina, que fue diseñada para mantener el amplio espectro de actividad antibacteriana de las tetraciclinas contra aerobios y anaerobios, Gram-positivos y Gram-negativos (215-217).

Las tetraciclinas penetran en el citoplasma bacteriano por un proceso dependiente de energía y se unen de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma (proteínas S7, S14, S19), bloqueando el acceso de los complejos aminoacil-ARNt, e impidiendo la continuación de la síntesis proteica (206, 218, 219) (Figura 9).

2.3.3. Macrólidos

Los macrólidos constituyen una extensa familia de antibióticos que han sido utilizados clínicamente desde el hallazgo de la eritromicina en los años 50 (219–221). Todos ellos se caracterizan por portar un anillo lactónico macrocíclico al que se unen uno o varios azúcares. Dependiendo del número de átomos de carbono que presenta el anillo, se clasifican en: macrólidos de 14 carbonos como la eritromicina, macrólidos de 15 átomos de carbono como la azitromicina y compuestos de 16 carbonos como la espiramicina (154, 209, 222). Otra variante son los cetólidos, como la telitromicina, que son un grupo de antibióticos derivados de la eritromicina, en los que el azúcar unido al carbono 3 se sustituye por un grupo cetónico.

Los macrólidos actúan uniéndose a un sitio adyacente al centro peptidil transferasa dentro del túnel de expulsión a través del cual va saliendo la cadena polipeptídica del ribosoma, a medida que se va formando (219, 221). Esto bloquea la extensión de la cadena peptídica y permite la disociación del peptidil-ARNt (209, 223, 224). En el caso de los cetólidos, se ha descrito también una inhibición de la formación de la subunidad 50S al evitar el ensamblaje de los ARNr 5S y 23S con las riboproteínas, con lo que se impide el inicio de la síntesis (225) (figura 9).

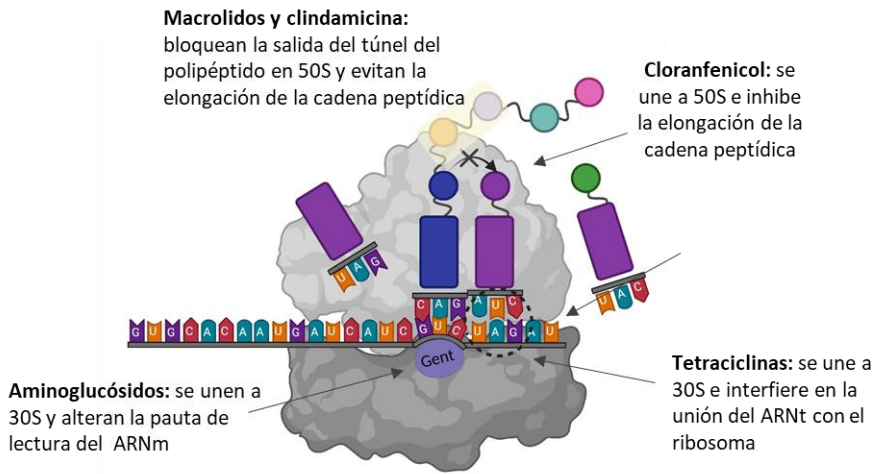


Figura 9. Esquema de las diferentes dianas de los inhibidores de la síntesis de proteínas. (Imagen creada con BioRender).

2.3.4. Oxazolidinonas

Representan una de las últimas familias de antimicrobianos incorporadas a la práctica clínica. Son compuestos obtenidos por síntesis artificial. Su representante en uso es el linezolid (226). Este antibiótico se fija a la subunidad ribosómica 50S, en el centro peptidiltransferasa dentro del ARNr 23S (dominio V), distorsionando así el punto de unión del formilmetionil-ARNt y evita, por lo tanto, la formación del complejo de iniciación (227–229).

2.3.5. Lincosamidas

Las lincosamidas son derivados básicos de la prolina desprovistos del anillo de lactona (222). Están formados por el aminoácido unido a un azúcar mediante una amida. La principal lincosamida es la clindamicina, un derivado semisintético de la lincomicina. Como en el caso de otros antibióticos, el sitio A de la

subunidad 50S del ribosoma, es el lugar de unión para la clindamicina (221, 230, 231), interfiriendo la unión del peptidil-ARNt (232) (figura 9).

2.3.6. Anfenicoles

El antibiótico más representativo de este grupo es el cloranfenicol, que fue aislado originalmente en *Streptomyces venezuelae*, pero que actualmente se obtiene de manera sintética al igual que sus derivados: tiamfenicol y florfenicol (233).

El cloranfenicol se une de manera reversible a la subunidad 50S bloqueando las funciones principales de los ribosomas (234) como la reacción de la peptidil transferasa, (235, 236) la unión y el movimiento de los sustratos a través del centro peptidiltransferasa (237) y la terminación de la traducción (238). Esto resulta en un proceso de traducción impreciso (figura 9). La unión reversible del cloranfenicol a la subunidad 50S ha sido estudiada en detalle mediante análisis de cristalografía de rayos X, encontrándose que el sitio de unión es exclusivamente sobre segmentos del ARNr 23S en la cavidad de la peptidiltransferasa y no involucra la interacción con proteínas ribosomales (230, 231, 239-242). En resumen, el cloranfenicol impide el ensamblaje de los aminoacil-ARNt que transportan los aminoácidos al ribosoma, inhibiendo la formación del enlace peptídico. El sitio de acción está cercano al de los macrólidos y al de la clindamicina, ya que estos antibióticos se inhiben competitivamente (243).

2.4. Antibióticos que actúan inhibiendo las funciones de la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática es vital para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo, y de esta forma controla la composición del medio celular interno. Las sustancias que alteran esta estructura, modifican la permeabilidad y provocan la salida de iones potasio, esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Los antibióticos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas.

La membrana consiste en una bicapa lipídica similar a otras membranas biológicas, compuesta por fosfolípidos anfipáticos.

Las membranas de la mayoría de los procariotas, a diferencia de las de eucariotas, carecen de esteroides; pero en muchas bacterias existe una clase peculiar de compuestos policíclicos, denominados hopanoides (triterpenoides pentacíclicos) que parecen condicionar parte de la rigidez de la membrana citoplásmica. Los hopanoides se sintetizan a partir del mismo tipo de precursores que los esteroides. La membrana se halla estabilizada por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y cationes como el calcio y el magnesio que se combinan con los fosfolípidos cargados negativamente. Además, insertas en ella, se encuentran múltiples proteínas transmembrana, que facilitan el transporte de sustancias hidrofílicas. Todos los sistemas de fosforilación, oxidación y transporte de electrones (citocromos) para la producción de energía se encuentran a nivel de la membrana celular.

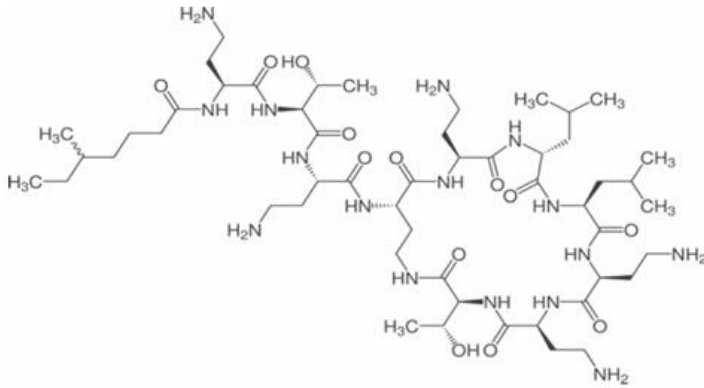


Figura 10. Estructura química de la colistina.

Dentro del grupo de antibióticos que afectan a la membrana, destacan las polimixinas, que forman un conjunto de cinco análogos estructurales diferentes clasificados desde el grupo A al E. La colistina (polimixina E) es un péptido catiónico descubierto en 1947 en *Bacillus polymyxa* (244) (figura10). Se introdujo en la práctica clínica en 1958 y se retiró en los años setenta debido a que generaba neuro y nefrotoxicidad. Sin embargo, debido al incremento de patógenos Gram-negativos multirresistentes junto con la escasez de nuevos antimicrobianos, ha sido necesaria la reintroducción de antibióticos antiguos como la colistina (245, 246). El mecanismo de acción de este antimicrobiano se basa en la unión de su parte peptídica con carga positiva, con los lipopolisacáridos de la membrana con carga negativa, provocando la desestabilización de la membrana, al interferir en el flujo de calcio y magnesio, y, por lo tanto, alterar la permeabilidad celular. La muerte celular es debida a la pérdida de sus componentes (246–248) (figura 11).

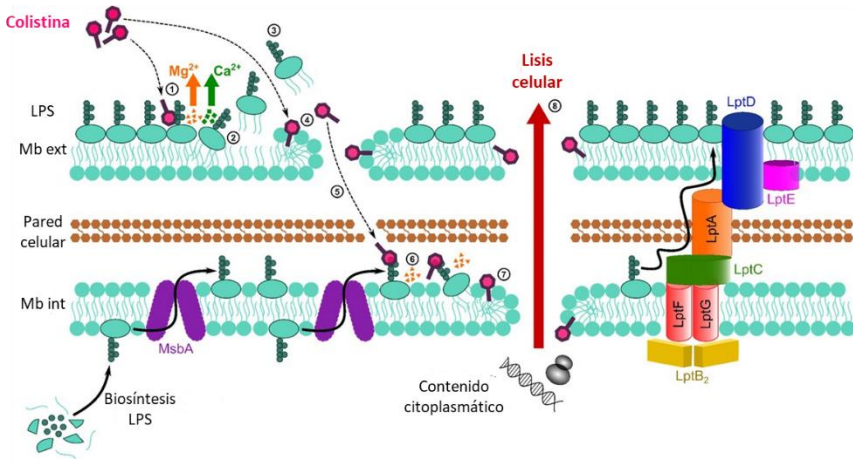


Figura 11. Diagrama del modelo de acción de la colistina propuesto por Sabnis *et al*, en 2021. La colistina se une al lipopolisacarido en la membrana externa ①, desplazando a los cationes que forman puentes entre los lipopolisacaridos, lo que conduce a la desestabilización de la membrana externa ②. Como consecuencia del debilitamiento de las uniones intermoleculares en la monocapa de polisacáridos, estos se liberan de la superficie bacteriana ③, permitiendo que la colistina dañe aún más la membrana externa mediante la acción de la cola lipídica de polimixina ④. Esto permite la entrada de la colistina al espacio periplásmico donde interacciona con los lipopolisacaridos de la membrana interna ⑤ que están esperando ser transportados a la membrana externa por la maquinaria Lpt ABCDEFG después de ser sintetizados en el citoplasma y remitidos a la cara externa de la membrana interna por MsbA. Como en la membrana externa, la colistina se une al lipopolisacarido dando lugar al desplazamiento de los puentes catiónicos y la ruptura de la membrana interna ⑥, que finalmente se permeabiliza ⑦, desembocando en la pérdida del contenido citoplásmico, lisis celular y muerte bacteriana ⑧ (Modificada de (247)).

Otro antibiótico perteneciente a este grupo es la daptomicina. Es un lipopéptido cíclico que actúa en la membrana plasmática de Gram-positivos, sin entrar en la célula. Se une a la membrana gracias al establecimiento de puentes de calcio con los fosfolípidos y produce la despolarización de la membrana con alteración del potencial eléctrico y la salida de iones potasio al exterior. Como consecuencia de

ello, se produce un bloqueo de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, que provoca la muerte bacteriana (249).

2.5. Antibióticos que actúan inhibiendo las vías metabólicas

Para la síntesis de metionina o las bases púricas y la timidina, se requiere de folatos, compuestos que algunas bacterias son incapaces de obtener del medio y deben sintetizar. El ácido tetrahidrofólico se obtiene a partir de una molécula pteridina y de un ácido paraaminobenzoico; que mediante la enzima dihidropteroato sintetasa dan lugar al ácido dihidropteroico. Posteriormente, por adición del ácido glutámico se forma el ácido hidrofólico, que es reducido por la dihidrofolato reductasa, formando así el ácido tetrahidrofólico, que es la forma activa del ácido fólico (154).

Las sulfamidas, como el sulfametoxazol, son antibióticos análogos del ácido paraaminobenzoico e inhiben de forma competitiva la dihidropteroato sintetasa (250). Por otra parte, la trimetoprima es un antibiótico que inhibe competitivamente la dihidrofolato reductasa (figura 12). La acción conjunta de sulfamidas y trimetoprima (cotrimoxazol) en las bacterias sensibles es sinérgica y resulta en una actividad bactericida (251).

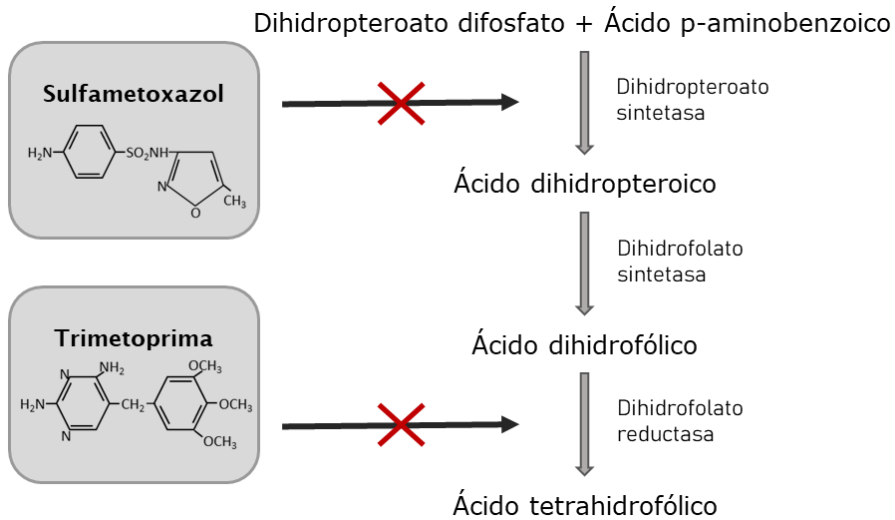


Figura 12. Vía de síntesis de folatos y puntos de acción de sulfametoxazol y trimetoprima (modificado de (251)).

3. Resistencia bacteriana a los antibióticos

3.1. Importancia de las resistencias

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica desde mediados del siglo XX, fue uno de los mayores avances de la medicina moderna. Su utilización no solamente permitió la cura de infecciones bacterianas, sino que también permitió llevar a cabo con éxito otros procesos médicos que requieren de intervenciones quirúrgicas, inmunosupresión, quimioterapia, etc. Sin embargo, existe una amenaza creciente que reduce la eficacia de estos fármacos; se trata de las resistencias antibióticas (252). La resistencia antibiótica se puede definir como la capacidad de una bacteria para crecer y multiplicarse a concentraciones de antibiótico que resultarían fatales para otras cepas de su misma especie (253). El desarrollo y diseminación de

resistencias se ven agravados por la falta de nuevos medicamentos que permitan combatir estas infecciones.

La multirresistencia bacteriana se ha convertido en el mayor problema de salud pública a nivel mundial (254, 255). En 2019, la OMS estimó que alrededor de cinco millones de muertes estaban asociadas a la resistencia a los antimicrobianos, incluidas 1,27 millones de muertes directamente atribuibles a la misma (figura 13) (121, 256-258). En 2021, el informe del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y de su Uso (GLASS) describió niveles de resistencia por encima del 50% en bacterias que causan de modo frecuente septicemia en hospitales, como *K. pneumoniae* o *Acinetobacter spp.* junto con más de un 20% de cepas aisladas de *E. coli*, resistentes tanto a fármacos de primera línea (ampicilina y cotrimoxazol) como a los de segunda línea (fluoroquinolonas) (259). La prevalencia de bacterias resistentes a colistina se ha incrementado al 43% en Italia, 37,3-28,8% en China, 31% en España y 20,8% en Grecia (260, 261). Un informe realizado por expertos de Reino Unido, indica que las infecciones intrahospitalarias provocan la muerte a 700.000 personas por año en el mundo y se estima que, si no se toman medidas, en 2050 la cantidad aumentará a 10 millones de personas (262). Las frecuencias de pacientes con bacteriemia inducida por patógenos resistentes del grupo ESKAPE aumentaron del 20 al 70% entre 2006 y 2011 (263).

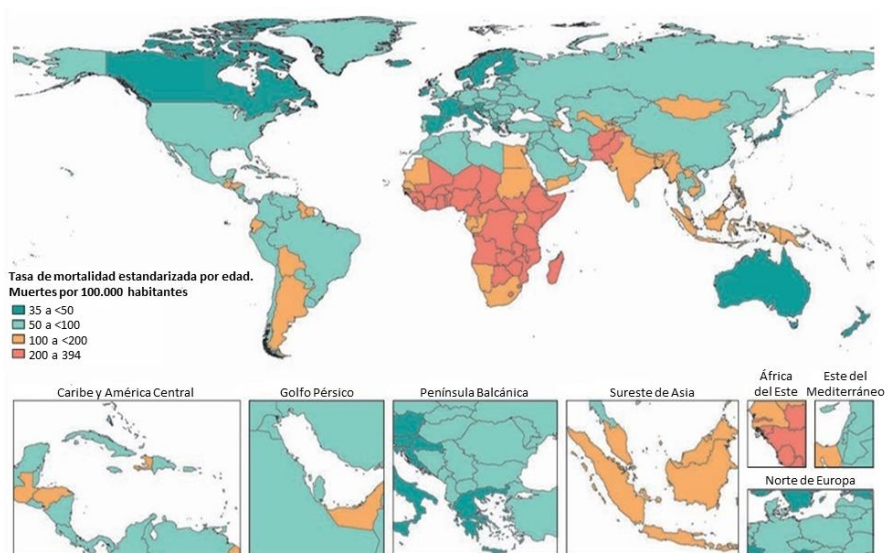


Figura 13. Tasa de mortalidad estandarizada por edad por cada 100.000 habitantes para 33 patógenos investigados a nivel mundial en 2019 (264).

La falta de soluciones terapéuticas está dando lugar a un incremento progresivo en la mortalidad, las estancias hospitalarias y los gastos médicos (264, 265). Los costes económicos de la resistencia antibiótica son muy elevados y continúan aumentando. En Estados Unidos, los costes médicos asociados con infecciones resistentes oscilan entre los 18.588 y 29.069 dólares por paciente (265). La resistencia bacteriana supuso una carga económica de 1.500 millones de euros, con más de 900 millones en costes hospitalarios y se calcula que los costes sociales alcanzarán los 569 millones de euros anuales en días extra de hospitalización de aquí a 2050 (266). Además, las infecciones bacterianas causadas por patógenos resistentes a antibióticos también suponen un coste económico para las familias y la comunidad, debido a la reducción de ingresos y los desembolsos para el cuidado de la salud. Se predice que aproximadamente 24 millones

de personas en el mundo alcanzarán extrema pobreza debido a bacterias resistentes en 2030, especialmente en países en vías de desarrollo; la cifra podría llegar hasta los 28,3 millones en 2050 (264, 267, 268).

La resistencia a los antibióticos es un hecho natural cuya expansión y diseminación lo ha convertido en un grave problema mundial. Son muchos los factores que han colaborado. Uno de los principales es el uso terapéutico humano inadecuado, ya sea por falta de adherencia al tratamiento o por hacerlo sin prescripción facultativa. A esto debemos sumar el efecto de los biocidas que seleccionan poblaciones y en ocasiones llevan a la sobreexpresión de bombas de expulsión, el constante vertido al medio ambiente de antibióticos a través de aguas residuales, el uso de estos antimicrobianos como promotores de crecimiento animal y protectores de cultivos (269, 270).

Las regulaciones y la legislación sobre el uso de antibióticos a nivel sanitario y productivo son diferentes en las distintas partes del mundo; por ejemplo, en EEUU continúa permitiéndose incorporar antibióticos a los piensos animales (269, 271). Los planes de contención nacionales son muy importantes para la concienciación ciudadana, como ocurre con nuestro Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (PRAN), pero no son suficientes y deben realizarse a nivel global. El problema es mundial. Es por ello que la Asamblea Mundial de la Salud aprobó en mayo de 2015 un plan de acción sobre la resistencia a los antimicrobianos, y en la Asamblea General de las Naciones Unidas de 2016, los jefes de estado se comprometieron a abordar de forma amplia y coordinada las causas profundas de las resistencias antimicrobianas (272).

3.2. Mecanismos de resistencia bacteriana

Hace décadas que los mecanismos de resistencia frente a antibióticos se han convertido en un importante tema de estudio (273-275). Los sistemas por los que las bacterias burlan el efecto de los antimicrobianos, pueden clasificarse mediante distintos criterios. Uno de ellos hace referencia al modo de adquisición de los mismos; así podemos hablar de resistencia adquirida y resistencia intrínseca o natural (274, 276, 277). La resistencia intrínseca se debe a la capacidad innata para disminuir o anular la eficacia de un antibiótico específico mediante alguna característica estructural o funcional (274). Estos grupos de bacterias normalmente no poseen la diana para ese antibiótico, lo que lo convierte en absolutamente inefectivo (278). Esta resistencia suele ser propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Así, por ejemplo, los Gram-negativos suelen ser resistentes a la vancomicina. La resistencia antibiótica adquirida, como su nombre indica, se debe a la obtención de genes de resistencia y/o generación de mutaciones (278, 279). Algunos autores añaden un tercer miembro a esta clasificación: los mecanismos de resistencia adaptativos (97). Estos mecanismos de resistencia son adquiridos como respuesta a estímulos ambientales y se revierten cuando el estímulo cesa (280).

Desde el punto de vista causal, los principales mecanismos de resistencia son (figura 14): la adquisición de genes de resistencia, la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, las bombas de expulsión, la inactivación enzimática de los antibióticos, la modificación de las dianas y la formación de biopelículas (97, 281-283). Estos mecanismos pueden trabajar de manera conjunta en cepas

clínicas, generando un elevado nivel de resistencia antibiótica (284-286).

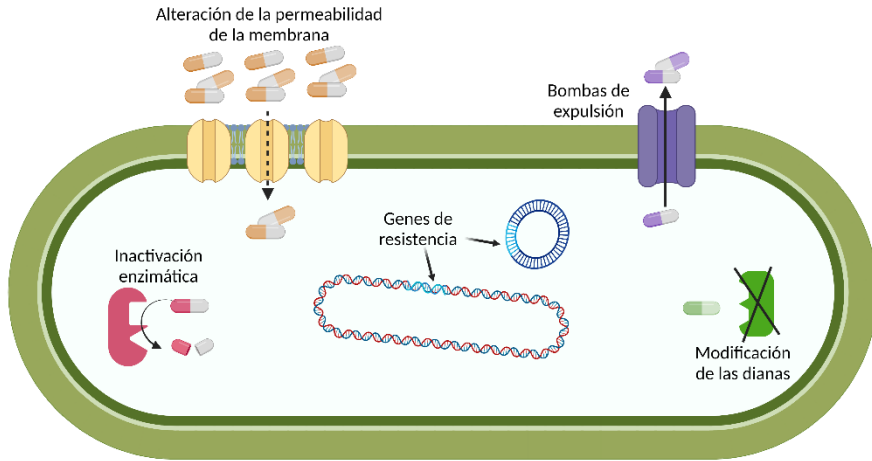


Figura 14. Esquema de los principales mecanismos de resistencia antibiótica. (Imagen creada con BioRender.)

3.2.1. Adquisición de genes de resistencia

La información genética esencial para la vida de una bacteria está presente en el cromosoma bacteriano. En la mayoría de las especies se trata de una única molécula de ADN de doble cadena, circular, superenrollada, cerrada por enlace covalente. Sin embargo, en algunas especies se pueden encontrar dos, de diferente tamaño. Los genes cromosómicos se organizan en operones, y su transcripción da lugar a un ARNm policistrónico. La información que contienen, se transmite únicamente de células madres a hijas mediante la replicación. Muchas bacterias poseen además ADN extracromosómico, también circular y cerrado, denominado ADN plasmídico por estar contenido en los plásmidos. Éstos, portan información genética para muchas funciones

que no son esenciales para la célula en condiciones normales de crecimiento, pero sí cuando se enfrenta a determinadas situaciones de estrés como la exposición a metales pesados o antibióticos.

La transferencia horizontal es el traspaso de información genética entre bacterias, ya sean de la misma especie o de especies diferentes, generando una plasticidad en los genomas que favorece la variabilidad genética y la capacidad de adaptación. Se han descrito tres vías por las que se produce este intercambio de material: conjugación, transducción y transformación (287).

La conjugación es un proceso por el cual se produce el intercambio de ADN por contacto físico directo entre el donante y el receptor. Esa comunicación suele producirse a través de un *pili* sexual o un poro de conjugación e implica un complejo proteico que favorece la transferencia (97).

En la transducción, es un bacteriófago el que transfiere el ADN entre bacterias. Estos virus utilizan las células bacterianas para su replicación y durante el proceso, secuencias del ADN como genes de resistencia, pueden ser incorporados a los bacteriófagos. Posteriormente, estos virus inyectarán su ácido nucleico en otras bacterias para su replicación. Así, la secuencia de resistencia puede recombinar con el ADN bacteriano (278).

En los procesos de transformación se produce la incorporación de ADN libre o desnudo, presente en el medio, al citoplasma bacteriano, a través de canales ampliamente conservados presentes en la membrana citoplasmática (288).

Los genes de resistencia a antibióticos implicados en estos procesos pueden ser portados por plásmidos, transposones, integrones y profagos (97). Un plásmido es una pequeña molécula circular de ADN de doble cadena, que se encuentra físicamente separada del cromosoma bacteriano y se replica de manera independiente (289). Estas estructuras suelen codificar enzimas, como por ejemplo las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en bacterias multirresistentes (290). También es posible que se integren en el cromosoma bacteriano, pasando a denominarse episomas. Los transposones son secuencias de inserción complejas, capaces de transportar más de un determinante genético. Pueden causar reordenamientos de ADN complejos y acumular varios genes de resistencia para conferir un fenotipo de multirresistencia (281). Los integrones son segmentos de ADN de doble cadena con tres componentes principales: una integrasa (gen *intl*), un promotor (*Pc*) y un sitio de recombinación (*attI*). Estos elementos son capaces de adquirir genes en tándem que portan factores de resistencia antibiótica, los cuales se integran vía recombinación específica de sitio (291).

Otro de los mecanismos que utilizan las bacterias para sobrevivir a situaciones de estrés, como son las exposiciones a antibióticos son las mutaciones espontáneas. La acumulación de mutaciones, puede llevar a desarrollar mecanismos de resistencia complejos y obtener una ventaja evolutiva a corto plazo (292, 293).

3.2.2. Alteración de la permeabilidad de la membrana

La membrana externa de Gram-negativos es una barrera selectiva formada por una bicapa asimétrica de fosfolípidos, acompañados de lipopolisacáridos, lipoproteínas y otras proteínas de transporte (286, 294, 295).

El transporte de pequeñas sustancias a través de las membranas es esencial para la entrada de nutrientes y otras sustancias en la célula, de la misma forma que lo es para la eliminación de residuos y toxinas y el bloqueo de su entrada (296, 297). Mientras que las sustancias hidrofóbicas son permeables atravesando estas membranas pasivamente, otras como los iones y las moléculas polares requieren de proteínas de transporte (296). Las sustancias con pesos moleculares superiores a los 600 Da normalmente no pueden atravesar la envoltura de Gram-negativos. Es por esto que los antibióticos con pesos moleculares más elevados, como la vancomicina, no pueden penetrar en este tipo de microorganismos y llevar a cabo su función, por lo que son resistentes intrínsecos a los mismos (298).

Unas de las proteínas de transporte más importantes son los canales de difusión denominados porinas (296). Las porinas son canales proteicos con estructura en β -barril, es decir, están formadas por una serie de láminas beta que se tuercen y enrollan para formar una estructura cerrada en donde la primera cadena de láminas beta se une a la última a través de puentes de hidrógeno (284, 297). Son las proteínas más abundantes en la membrana externa de los Gram-negativos y se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios. Desde el punto de vista estructural, pueden ser monoméricas,

diméricas o triméricas. Teniendo en cuenta su actividad, podemos hablar de específicas (con sitios de unión característicos) y canales inespecíficos (seleccionan el paso las moléculas por sus propiedades físicas) (297, 299). Además de su función como transportadoras, también tienen un importante papel estructural (298). Las porinas se considera que son punto de entrada para muchos antibióticos como las tetraciclinas, el cloranfenicol, los β -lactámicos y las fluoroquinolonas. Otros antibióticos penetran difundiendo a través de la bicapa lipídica, aprovechando su carácter lipófilo, como los macrólidos (284, 300, 301). Entre las porinas más importantes se encuentran: OmpF, OmpC y PhoeE en *E. coli*, OmrD y OprF en *P. aeruginosa*, OmpK35 y OmpK36 en *K. pneumoniae*, y OmpA y Omp33-36 en *A. baumannii* (302, 303).

La desregulación, la modificación estructural o la delección de genes codificantes de las porinas, da lugar a alteraciones en las mismas, tales como la reducción del diámetro, la pérdida de la diana específica de unión o la simple reducción del número de porinas. Esta situación hace que se produzca una disminución de la entrada de antibióticos y por lo tanto se reduzca su posibilidad de acción (278, 283). Pese a esto, el papel de las porinas específicas en la resistencia antibiótica sigue sin estar todavía claro (298). Este mecanismo no suele ser suficiente para conferir una resistencia absoluta y suele combinarse con otros, como la actuación de las bombas de expulsión o la inactivación enzimática.

El secuestro es un mecanismo de resistencia relacionado, donde las proteínas de unión inhiben el acercamiento del antibiótico a su diana (257). En las bacterias que producen antibióticos, como la bleomicina, las propias bacterias productoras secuestran el antibiótico expresando las proteínas de unión BlmA, TlmA y ZbmA (304).

Además, algunas bacterias pueden eludir una respuesta antibacteriana regulando a la baja, la expresión de estos péptidos (305). En general, la mayoría de las bacterias contienen múltiples mecanismos de cooperación para permitir la respuesta a los agentes antibacterianos, como los antibióticos o las moléculas activas que las propias bacterias producen (306).

3.2.3. Bombas de expulsión

Los sistemas de expulsión activos en bacterias fueron descubiertos por Ball y McMurry en 1980 cuando estudiaban la resistencia de *E. coli* a tetraciclina (307, 308). Estas bombas se sitúan en la membrana citoplasmática de Gram-positivos y en el espacio intermembrana de microorganismos Gram-negativos (309, 310). Se trata de proteínas de membrana que permiten la salida hacia el exterior de sustancias no relacionadas estructuralmente, como productos del metabolismo bacteriano, tóxicos o los propios antibióticos, impidiendo que alcancen la concentración óptima para su acción (275).

Las bombas de expulsión son estructuras normales de las bacterias y existen en cepas sensibles. Cuando se produce una exposición prolongada en el ambiente a determinados sustratos, los genes que codifican este mecanismo de expulsión se activan y expresan, aumentando la capacidad de expulsión, lo que puede conducir a la resistencia antibiótica (311, 312).

Filogenéticamente, las bombas se pueden clasificar en 5 familias: superfamilia dependiente de ATP (ABC, ATP binding cassette), superfamilia del facilitador principal (MFS, major facilitator superfamily), familia de expulsión de múltiples fármacos y tóxicos

(MATE, multidrug and toxic-compound extrusion), familia de pequeñas proteínas con resistencia a múltiples fármacos (SMR, small multidrug resistance) y familia de resistencia a división por nodulación (RND, resistance nodulation-division) (312-318).

Los transportadores de la superfamilia ABC utilizan como fuente de energía la hidrólisis del ATP. Su estructura consta de dos dominios transmembrana y dos dominios de unión al nucleótido (319, 320). Pueden clasificarse en heterodiméricos y homodiméricos. Se cree que estos últimos poseen los mismos dominios, pero con los lugares de unión del ATP degenerados (321). En Gram-negativos hay pocos ejemplos de este tipo de transportadores (17). Uno de ellos es MacB en *E. coli* (322).

La superfamilia MFS consiste en sistemas formados por una sola proteína de membrana. El paso de sustancias se puede dar mediante tres mecanismos: simporte, antiporte y uniporte. El proceso de simporte consiste en el paso del sustrato en asociación con un ión en la misma dirección. El antiporte se refiere al paso de dos o más sustratos en direcciones contrarias al mismo tiempo. El uniporte se considera el transporte de un solo tipo de sustrato a través de la membrana (323, 324). Dentro de esta superfamilia destacan las bombas TetA y TetB que confieren resistencia a tetraciclina en *A. baumannii* (325, 326).

Las bombas de expulsión de la familia MATE están compuestas por una sola proteína que posee doce dominios transmembrana (275). Un integrante de esta familia es la bomba AbeM de *A. baumannii*, que confiere un aumento de cuatro veces el valor de la CMI de

ciprofloxacino, norfloxacino, gentamicina y bromuro de etidio y de dos veces en el caso de cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim... (326, 327). Esta bomba utiliza la fuerza protón-motriz como fuente de energía, a diferencia de otras de esta familia que utilizan el gradiente de cationes sodio (17).

La familia SMR constituye uno de los grupos que realizan movimiento dependiente de protones. Están formados por una sola proteína de tamaño reducido. Un integrante de esta familia es AbeS, relacionado con fenómenos de multirresistencia en *A. baumannii* (17).

La mayoría de las bombas de expulsión múltiple de Gram-negativos pertenecen a la familia RND. Están formadas por tres componentes: una proteína transportadora ubicada en la membrana interna, una proteína de fusión de membrana y una proteína de membrana externa (17, 328–330). Como representante de esta familia podemos citar a AdeABC que contribuye a la resistencia a un amplio espectro de antibióticos en *A. baumannii*, como tetraciclina, eritromicina, aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetoprim, fluoroquinolonas, algunos β -lactámicos y bromuro de etidio (303, 329, 331, 332).

3.2.4. Inactivación enzimática

Cuando los antibióticos han atravesado las barreras protectoras de las bacterias, un mecanismo de resistencia con gran peso es la inactivación enzimática de los mismos. El principal proceso es la hidrólisis, pero también pueden ocurrir acetilaciones, fosforilaciones o adenilaciones (333). Todas estas modificaciones enzimáticas no implican cambios en los componentes celulares de la bacteria, porque

tienen un coste energético y vital mucho menor que otros mecanismos como la alteración de las dianas (303).

3.2.4.1. β -lactamasas

Las enzimas β -lactamasas son el mecanismo más común de resistencia antibiótica en enterobacterias (282). Estas enzimas, codificadas por los denominados genes *bla*, hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico (334). Muchas de ellas actúan sobre varios antibióticos del grupo y reciben el nombre de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Los Gram-positivos excretan la enzima, mientras que en Gram-negativos se localiza en el espacio periplásmico, inactivando el antibiótico antes de que se una a las PBP's (278).

Los antibióticos β -lactámicos son productos naturales de algunos microorganismos. Por lo tanto, en la naturaleza, ciertos microorganismos sintetizaron β -lactamasas para sobrevivir (335). En la práctica clínica, para superar la resistencia mediada por estas enzimas, se suele utilizar terapia combinada pautando junto con los antibióticos β -lactámicos, inhibidores de las β -lactamasas, como clavulanato, sulbactam o tazobactam (336).

Existen diversas clasificaciones para las β -lactamasas, pero la más sencilla es la que se establece en base a su secuencia aminoacídica, indicando 4 tipos: clase A, B, C y D (337). Las de la clase B son metaloenzimas dependientes del zinc, mientras que las otras tres son metalo-independientes, con serina en el sitio activo (338).

Dentro de la clase A podemos encontrar tanto BLEE como β -lactamasas de espectro reducido (29). Estas enzimas son muy

sensibles a los inhibidores como clavulanato, sulbactam y tazobactam (339). Entre las familias más importantes de este grupo se encuentran TEM, SHV o CTX-M, codificadas por elementos móviles y con tendencia a difundirse entre los miembros de *Enterobacteriaceae*. Las familias VEB y PER también pertenecen a este grupo y suelen estar presentes en los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (281). Lo mismo ocurre con la carbapenemasa KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase), descubierta en la bacteria que le da nombre, pero que actualmente se ha extendido a otras especies de la familia *Enterobacteriaceae* como *E. coli* (340).

Las metalolactamasas de clase B, descubiertas inicialmente en *P. aeruginosa*, hidrolizan todos los β -lactámicos, pero no el aztreonam (341), y son inhibidas por quelantes como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y el ácido dipicolínico (342). Este tipo de β -lactamasas causan alto grado de resistencia a carbapenémicos (343). Entre las familias más importantes podemos destacar: VIM, IMP y NDM (282).

Las β -lactamasas cromosómicas AmpC (clase C) se han encontrado en muchas especies de *Enterobacteriaceae* pero no en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *Salmonella* y muchas especies de *Citrobacter* (282, 344, 345). Los genes que codifican la enzima AmpC, habitualmente están asociados a genes reguladores (*ampR*) controlando su expresión, pudiendo ser estos los causantes de las alteraciones que conducen a la resistencia (282). En el caso concreto de *A. baumannii*, la inserción de IS*Aba1* antes de los genes *ampC*, provoca una sobreexpresión de AmpC, confiriéndole resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido (346).

Las β -lactamasas de clase D u oxacilinasas (OXAs), son dependientes de serina y comúnmente hidrolizan la oxacilina mucho más rápido que la bencilpenicilina, de ahí su nombre (347). Se han identificado más de 400 tipos, muchos de los cuales son carbapenemasas (348). Pese a que muchos de sus hallazgos se produjeron en *A. baumannii*, están presentes en muchas enterobacterias (1, 282).

3.2.4.2. Modificación de aminoglucósidos

Parte de las resistencias a aminoglucósidos se deben a procesos relacionados con modificaciones enzimáticas que inactivan a los antibióticos. Estos mecanismos son fundamentalmente tres, catalizados por las siguientes enzimas: aminoglucósido O-nucleotidiltransferasas (ANTs), aminoglucósido N-acetiltransferasas (AACs) y aminoglucósido O-fosfotransferasas (APHs) (349). Estas enzimas alteran los correspondientes grupos funcionales en los aminoglucósidos, debilitando la capacidad de unión del antibiótico a la diana en el ribosoma. Su acción es selectiva, pero pueden actuar sobre diferentes moléculas de aminoglucósidos (29). Estas enzimas suelen estar codificadas por genes presentes en elementos transponibles y se intercambian entre bacterias patogénicas (1).

3.2.4.3. Inactivación de macrólidos

Con respecto a los macrólidos, hay tres posibles modificaciones enzimáticas que dan lugar al desarrollo de resistencias: la hidrólisis de eritromicina mediada por enzimas codificadas por los genes *ereA* y *ereB*, que es característica de *S. aureus* y de las especies del género

Enterococcus (350), la glucosilación mediada por los genes *mgt* (351, 352) y la fosforilación debida a las proteínas codificadas por el grupo de genes *mph* (353).

3.2.5. Modificación de las dianas

Muchos antibióticos se unen a una diana primaria con alta afinidad, lo que suele llevar a la inhibición de alguna función celular esencial que conduce a la inhibición del crecimiento o a la muerte (354). Las bacterias son capaces de llevar a cabo modificaciones en las dianas antibióticas generando un blanco con menor afinidad por el antimicrobiano (303, 355). Los mecanismos para llevar a cabo este proceso son variados (281). El primer caso conocido de resistencia de este tipo, fue la alteración de la diana de la meticilina en *S. aureus* (356). Otra muestra de la efectividad de estos sistemas son las mutaciones de las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR) en las subunidades GyrA de la ADN girasa y/o ParC de la topoisomerasa IV, que conllevan resistencia a fluoroquinolonas tanto en Gram-positivos como en Gram-negativos (357, 358). Las metilaciones también son importantes en este campo, como en el caso de la actuación sobre los ribosomas por parte de macrólidos y lincosamidas (359). Con respecto a los aminoglucósidos, una de las formas más habituales de desarrollar resistencias es mediante la modificación de su diana. Una ARN-metiltransferasa altera la región de unión en la región ribosomal 16S ARN (278). En el caso de las polimixinas, las modificaciones del lípido A de la membrana externa impiden su correcta actuación (360, 361).

Otro de los mecanismos de resistencia antimicrobiana se basa en la capacidad de las bacterias para sintetizar sustancias que compiten con el fármaco por el sitio activo. Un ejemplo de este tipo son las proteínas Qnr (*quinolone resistance*). Los genes *qnr* codifican una familia de pentapéptidos repetidos. Suelen encontrarse en plásmidos multirresistentes unidos a otros determinantes de resistencia, estando presentes tanto en Gram-positivos como en Gram-negativos. Su acción se centra fundamentalmente en conferir resistencia a quinolonas reduciendo la unión a topoisomerasas. La primera proteína Qnr que se descubrió fue Qnr A, es un polipéptido de 218 aminoácidos. Tras QnrA se descubrieron también: QnrS, QnrB, QnrC, QnrD y QnrVC. Los genes *qnr* que las codifican difieren en secuencia un 35% con *qnrA* y entre ellos (362–364).

Qnr puede unirse a la girasa y a sus respectivas subunidades GyrA y GyrB. La unión de Qnr a la girasa no requiere de la presencia del complejo de enzima-ADN-quinolona, ya que se ha visto que la unión se puede producir en ausencia de ADN relajado, ciprofloxacino o ATP. La formación del complejo Qnr-girasa se produce antes de la formación del complejo de escisión. Se ha visto también que se produce una disminución en la unión al ADN por parte de la girasa cuando la enzima interacciona con Qnr. Por lo tanto, es posible que el intermediario de reacción reconocido por Qnr sea un paso temprano en el ciclo catalítico de la girasa. Las quinolonas se unen más tarde en el ciclo catalítico y estabilizan un complejo ternario formado por el fármaco, la girasa y el ADN. Al disminuir la unión de la girasa al ADN, la Qnr puede reducir la cantidad de objetivos holoenzima-ADN para la inhibición por las quinolonas (365).

3.2.6. Formación de biopelículas

Otra línea de defensa bacteriana frente a los antibióticos es la formación de películas. Se definen como un agregado de microorganismos adheridos entre sí sobre una superficie, ya sea orgánica o inorgánica, que se encuentran embebidos en una matriz formada por su propia secreción de una sustancia polimérica extracelular (EPS), que incluye exopolisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular (366-375). Un biofilm bacteriano puede estar compuesto por un solo microorganismo o por una mezcla de bacterias, hongos, arqueas, protozoos y levaduras. Posee una estructura de canales que controla la liberación de gases, nutrientes y antimicrobianos (373). Comparado con los biofilms de una sola especie, las biopelículas multiespecie poseen características dependientes de las interacciones interespecie: aumento de la masa de la película, aumento del número de células, mayor actividad metabólica de los miembros de la comunidad, incremento de la tolerancia a antimicrobianos y cambios en la estructura y organización espacial (376).

La formación de biopelículas bacterianas es un proceso que engloba varios pasos: la adhesión molecular a la superficie de un objeto, la unión bacteriana y secreción de sustancias poliméricas extracelulares, la maduración de la biopelícula a través de la formación de colonias y la liberación de células bacterianas y su dispersión para formar una nueva biopelícula (377).

Se cree que el sistema de *quorum sensing* (percepción de cuórum) juega un papel importante en la formación de biopelículas.

Este modelo de comunicación es capaz de mantener una densidad de población a través de señales moleculares, entre las que se encuentra un tipo de lactonas (29).

La formación de biopelículas no es solo un modo de crecimiento para sobrevivir a ambientes hostiles; también aumenta el nivel de resistencia a agentes antimicrobianos (373, 378). Las bacterias que crecen en biopelículas son menos sensibles a los antibióticos y desencadenan una respuesta inmune por parte del hospedador, menor que las que lo hacen libremente (379). Aunque existen varias posibles teorías para explicar el aumento de resistencia en biopelículas, es obvio que se debe a una combinación de mecanismos (380, 381). La matriz EPS puede limitar e incluso impedir la absorción o el transporte de agentes antimicrobianos a las células, estableciendo interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, ya sea por exclusión por tamaños, o por degradación de esos agentes (382, 383). Se ha observado también que los biofilms gruesos son una barrera más eficiente que los finos para retrasar la penetración de los antibióticos (384). Además, el crecimiento de bacterias implicadas en un biofilm se ralentiza o incluso puede llegar a pararse, debido a la cantidad limitada de nutrientes en el medio (385). Pese a ello, parece que la sensibilidad antibiótica puede ser recuperada cuando la bacteria pierde la protección de la biopelícula, por lo que este mecanismo de resistencia parece fruto de la adaptación e independiente de mutaciones genéticas (386).

3.2.7. Células persistentes

En las biopelículas podemos encontrar un tipo de células denominado “persistente” (387). Este fenotipo protector tiene un

comportamiento similar al de las esporas, no siendo afectado por las concentraciones inhibitorias de los agentes antimicrobianos, además de tener la capacidad de sobreponerse a condiciones de estrés debido a su programación transcripcional (289, 388). Una vez que cesa la exposición a antibióticos, estas células recuperan su capacidad de crecimiento (389). Es por ello que la presencia de células persistentes es un gran obstáculo a la hora de eliminar infecciones de modo completo y de prevenir su recurrencia (390, 391). Tenemos que destacar que no se trata de tolerancia ni de un tipo de resistencia antibiótica al uso, ya que no es una cualidad heredable (392). Se investiga acerca de su naturaleza tratando de comprender por qué solo afecta a una parte de la población y como, además de burlar a los antibióticos, también puede escapar al sistema inmune. Se estima que uno de los desencadenantes más importantes son los sistemas toxina-antitoxina que se ponen a funcionar en situaciones de estrés para reducir el metabolismo (390).

4. Test de sensibilidad antimicrobiana

Una de las tareas más importantes del laboratorio de microbiología clínica es la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en cepas aisladas e identificadas. El objetivo de este tipo de pruebas es detectar la posible resistencia a fármacos en patógenos comunes y asegurar la sensibilidad a los fármacos de elección antes de su prescripción, a ser posible (393). El catálogo de test de susceptibilidad microbiana (AST) es muy amplio llevándose a cabo a través de una gran variedad de técnicas (394). Los métodos más

utilizados son los que emplean microdiluciones en medio líquido ya sea de manera manual o automatizada. Otros de los más comunes son los discos de difusión y los métodos de difusión por gradiente. Actualmente se han desarrollado otros nuevos, basados en el estudio de la morfología y en técnicas de biología molecular. Todos ellos tienen ventajas e inconvenientes dependiendo de los microorganismos sobre los que se quieran aplicar, los antibióticos a evaluar, o incluso los recursos disponibles. Algunos proporcionan resultados cuantitativos como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y otros cualitativos indicando a que categoría pertenecen (sensible, intermedia o resistente) (393).

4.1. Sistemas manuales

4.1.1. Métodos de dilución

El efecto del antimicrobiano será evaluado utilizando distintas concentraciones del mismo, obtenidas a través de diluciones seriadas, ya sea en caldo de cultivo o en agar. La concentración más baja de cada antibiótico que inhiba el crecimiento visible del microorganismo, será designada como la CMI.

Estos métodos tienen múltiples ventajas. Entre ellas destacan la flexibilidad de las dosis empleadas y el hecho de que se pueden evaluar la mayoría de los patógenos habituales utilizando un medio de cultivo general como Mueller-Hinton (M-H). Para los microorganismos que tienen requerimientos especiales, este medio se puede suplementar o ser sustituido por otro (395).

4.1.1.1. Dilución en medio líquido

La dilución en tubo o macrodilución fue el primer test que se desarrolló de este tipo (396). Este método incluye la preparación de diluciones seriadas con doble concentración de antibiótico en cada tubo (396, 397). Estos tubos con el antibiótico se inoculan con una suspensión de bacterias a una concentración de $1-5 \cdot 10^5$ UFC/ml (UFC: Unidades formadoras de colonias) y se mantienen a 35 °C durante toda la noche. El crecimiento de la bacteria se evidencia como turbidez y la concentración más baja donde no se observe crecimiento será determinada como el valor de la CMI (figura 15d). La exactitud de esta prueba se considera de una dilución por encima o por debajo, debido fundamentalmente a la preparación manual de las soluciones de antibiótico. La ventaja de este método es que el resultado es cuantitativo; pero es una técnica tediosa (393).

Este método se adaptó para ser llevado a cabo en placas multipocillo en lugar de tubos, surgiendo lo que se conoce como microdilución (figura 15c). Las bandejas estándar (comerciales) contienen 96 pocillos de un volumen de 100 μ l y se suelen utilizar para analizar 12 antibióticos con 8 concentraciones diferentes (393, 397). Estas placas también se pueden preparar de forma manual. Las placas se inoculan con 0,01 - 0,05 ml de una suspensión bacteriana con una concentración de $1-5 \cdot 10^5$ UFC/ml. Después de la incubación, se determina la CMI de la cepa ya sea mediante la observación directa o utilizando un sistema automatizado (397). Esta técnica proporciona un resultado cuantitativo, como es la CMI; es reproducible; reduce gastos, espacio y materiales frente las macrodiluciones; y se pueden recoger los datos de forma informatizada si utilizamos un lector de placas. La

mayor desventaja que se achaca a este método, es la escasa variedad en los paneles comerciales. En caso de prepararse de forma manual en el laboratorio, cae en las desventajas propias de la manipulación humana.

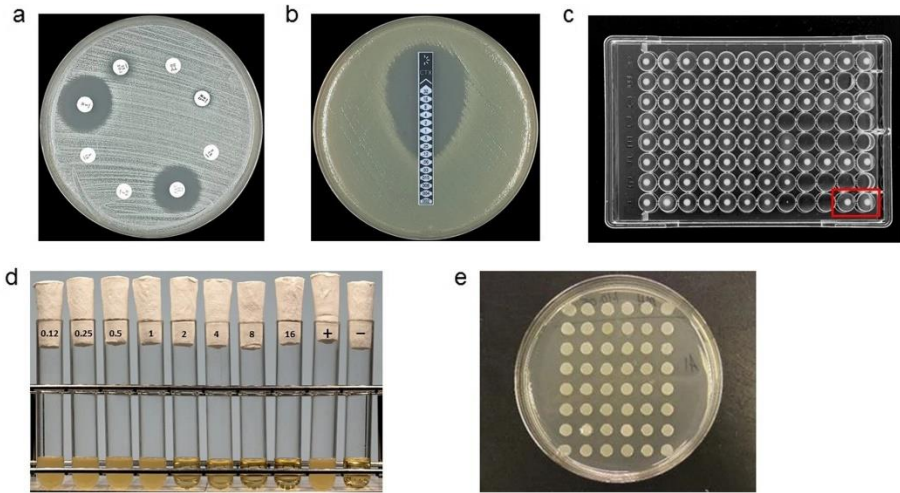


Figura 15. Resultados obtenidos con las diferentes técnicas manuales de detección de susceptibilidad antibiótica: discos de difusión **(a)**, e-test **(b)**, microdilución **(c)** (los pocillos recuadrados se corresponden con los controles de crecimiento), macrodilución **(d)** y dilución en agar **(e)** (398).

4.1.1.2. Dilución en agar

El agar Mueller-Hinton es el medio recomendado para las pruebas de rutina de crecimiento rápido con la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Los disolventes y diluyentes que se requieren para preparar las soluciones madre de antibióticos y los métodos utilizados para llevar a cabo tales pruebas se definen en el protocolo estándar del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para AST en dilución (399). Este método requiere mucho tiempo para preparar las placas de ensayo, especialmente cuando el número

de compuestos a evaluar es alto o cuando sólo se va a estudiar un número limitado de bacterias (figura 15e). Por estas razones, la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica no utilizan este método de manera rutinaria (395).

4.1.2. Métodos de difusión

4.1.2.1. Discos de difusión

Los discos de difusión constituyen otro método de detección de sensibilidad simple y bien estandarizado (397, 400, 401). De manera general, se realiza sembrando en una placa de agar Mueller-Hinton, un inóculo a una concentración de $1-2 \cdot 10^8$ UFC/ml. A continuación, se colocan los discos de papel impregnados en antibiótico sobre la superficie de la placa y se incuban a 35 °C entre 16 y 24 horas. Transcurrido ese tiempo se mide en milímetros el diámetro del área de inhibición del crecimiento (393). Esta medida se interpreta siguiendo los criterios publicados por el CLSI (402).

El agente antimicrobiano difunde del disco al agar, y a medida que aumenta la distancia al disco, la concentración disminuye de forma logarítmica, creando un gradiente de concentración alrededor del soporte. Simultáneamente las bacterias no inhibidas por la concentración del antimicrobiano se dividen generando una capa visible. En las áreas donde el organismo es inhibido, se genera el halo de inhibición de crecimiento (figura 15a) (395). Los resultados que proporciona esta técnica se pueden considerar cualitativos ya que permiten clasificar las bacterias en sensibles, intermedias y resistentes (393). Sin embargo, algunos sistemas de lectura comerciales permiten estimar el valor de la CMI en función del diámetro del halo (403, 404).

La mayor ventaja de esta técnica es la sencillez, ya que puede realizarse sin necesidad de un equipamiento especial, los resultados son fáciles de interpretar, tanto en el laboratorio como para el clínico, es muy económica, reproducible, hay variedad de discos disponibles y en cada placa se pueden colocar varios diferentes (393). Su desventaja principal es que no ha evolucionado hacia una mecanización o automatización (395).

4.1.2.2. Método del Épsilon test

El Épsilon test (Etest) consiste en una tira de plástico o cartón cuya parte inferior está impregnada con un gradiente de concentración del antibiótico en estudio y la superior está serigrafiada con una escala que indica los valores de las 15 concentraciones que porta. Esta tira se coloca sobre una placa de agar Mueller-Hinton que ha sido previamente inoculada, con la ayuda de una torunda de algodón, con una suspensión de microorganismos a una concentración equivalente a 0,5 McFarland; es decir, con una absorbancia a 600 nm de entre 0,08 y 0,1; asegurándose así, una densidad celular adecuada, previniendo posibles falsos positivos o negativos. A continuación, se introduce en un incubador a 35 °C durante 18 horas (394). Una vez transcurrido este tiempo, se determina la CMI como el punto de intersección de la parte inferior del área de inhibición del crecimiento en forma de elipse con la tira reactiva (figura 15b) (393). Los Etest (bioMérieux AB BIODISK) son la versión comercial más extendida, pero existen otros como las tiras de CMI (Liofilmchem).

Se trata de un método flexible que permite elegir los antibióticos que se quieren evaluar. Se pueden colocar varios por placa de agar

dependiendo del tamaño de esta, y también se pueden analizar sinergias. Es el mejor método para microorganismos con requerimientos especiales, ya que se puede adaptar, en cierta medida, a sus condiciones de crecimiento (405–407). Es una técnica igual de sencilla que los discos de difusión, pero con la gran ventaja de que aportan un resultado cuantitativo. La CMI obtenida por este método se correlaciona de manera general con las que se obtienen con los métodos de dilución (394, 405–408), salvo en el caso concreto de algunos antibióticos en ciertos microorganismos (406, 409). El mayor inconveniente que presentan es su coste, ya que, en caso de querer testar una gama amplia de antibióticos, se encarece respecto a los otros métodos.

4.2. Sistemas automatizados

Las técnicas descritas hasta el momento se realizan de forma manual. Eso trae consigo muchos inconvenientes, sobre todo por limitar el número de muestras que se pueden manipular, el espacio de trabajo que se requiere y el tiempo que se tarda en dar los resultados. Dada la necesidad de procesar gran cantidad de muestras en la mayor brevedad posible, han surgido equipos que automatizan las técnicas antes mencionadas (410–412). Además, también permiten estandarizar la lectura de los resultados y obtenerlos de manera más exacta, al permitir detectar cambios en el crecimiento bacteriano más sutiles que los visibles al ojo humano. Existen cuatro sistemas automatizados aceptados por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en EEUU. Tres de ellos se consideran rápidos, proporcionando los

resultados en entre 3,5 y 16 horas y el cuarto se demora más por necesitar una incubación durante toda la noche (413).

MicroScan WalkAway (Siemens Healthcare Diagnostics) es un gran dispositivo con doble función, incubador y lector, ya que puede incubar y analizar entre 40 y 96 placas de microdilución. Periódicamente el aparato hace mediciones del crecimiento mediante un fotómetro o un fluorómetro. Los paneles para Gram-negativos que contienen sustratos fluorogénicos, pueden ser leídos tras 3,5 y 7 horas. Sin embargo, cuando la valoración de sensibilidad se hace basada en turbidimetría, los resultados se obtienen tanto para Gram-negativos como para Gram-positivos en un periodo de tiempo entre 4,5 y 18 horas.

BD Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostics) es también un incubador-lector que tiene capacidad para procesar 99 paneles en los que se inoculan directamente las muestras a estudio. El equipo monitoriza cada panel de 20 en 20 minutos utilizando tanto turbidimetría como colorimetría para detectar el crecimiento bacteriano. Es útil tanto para Gram-positivos como para Gram-negativos reportando el valor de la CMI entre 6 y 16 horas.

Vitek 2 System (bioMérieux) utiliza bandejas de tamaño muy reducido que contienen 64 pocillos. Este sistema monitoriza el crecimiento por turbidimetría y permite realizar entre 30 y 240 test simultáneamente. Proporciona los resultados entre 4 y 10 horas.

Sensititre ARIS 2X (Trek Diagnostic Systems) necesita realizar una incubación durante toda la noche. Posee una capacidad de

64 paneles con 96 pocillos cada uno. El crecimiento se determina mediante fluorescencia tras 18-24 horas de incubación.

Uno de los inconvenientes iniciales de los métodos rápidos automatizados es que no tenían capacidad para detectar algunos tipos de resistencia antimicrobiana incluyendo las β -lactamasas inducibles y la resistencia a vancomicina. Sin embargo, los equipos actualmente aprobados por la FDA, presentan mejoras significativas a nivel de sus programas informáticos. Estas modificaciones han permitido en unos casos, llevar a cabo incubaciones específicas para combinaciones problemáticas de organismo y fármaco y en otros, realizar la edición de los resultados evitando que se reporten resultados poco fiables. En determinados casos, estas modificaciones dan como resultado una incubación prolongada de más de 10 horas, para asegurar resultados precisos, haciéndolos así menos rápidos (393).

4.3. Antibiogramas rápidos: técnicas emergentes.

Teniendo en cuenta la premura con la que se ha de dar un diagnóstico, otro de los factores a tener en cuenta es, el tiempo que transcurre desde que una muestra de sangre u otros fluidos corporales llega al laboratorio, hasta que se puede iniciar un test de sensibilidad antibiótica. Para paliar la necesidad de un cultivo, una opción es generar un pellet bacteriano a partir de la muestra, sobre el que se puedan llevar a cabo las técnicas de identificación y de sensibilidad. Algunos estudios han conseguido que las identificaciones mediante MALDI-TOF se obtengan en menos de una hora y que los AST automatizados y/o los llevados a cabo mediante disco de difusión, proporcionen resultados en 8 y 18 horas respectivamente (414). El

desarrollo de antibiogramas rápidos es un tema en plena expansión y está siendo abordado desde múltiples puntos de vista, no solo desde la evaluación del crecimiento, sino también, observando cambios en el metabolismo bacteriano, en los procesos físico-químicos celulares e incluso aplicando técnicas de genética molecular. La distinción es difusa y algunas de estas técnicas físico-químicas o de genética molecular también pueden ser aplicadas para monitorizar el crecimiento celular.

4.3.1. Antibiogramas basados en el análisis de crecimiento bacteriano.

Algunas técnicas rápidas de detección de resistencias tienen una base muy sencilla, simplemente, la detección en tiempo real del crecimiento bacteriano. Los avances en los sistemas de captura de imágenes, han permitido el desarrollo de sensores con alta sensibilidad y resolución, que son capaces de realizar análisis biológicos. Estos sistemas se utilizan con frecuencia para estudios morfológicos y de crecimiento en cultivos bacterianos. La obtención de imágenes directas de las bacterias comprende pasos sencillos de preparación de la muestra, y elimina los tediosos pasos de la inyección continua de la misma, la carga de células y la identificación celular basada en el recuento (415). Uno de estos sistemas de detección óptica comercializado es el **oCelloScope**. Se trata de una plataforma portátil desarrollada para proporcionar información sobre susceptibilidad de manera rápida y eficaz, con alta sensibilidad y partiendo de una baja concentración bacteriana. Como demostración de su utilidad, se ha empleado con muestras de orina porcina, obteniendo imágenes en cada lapso de tiempo de 96 combinaciones de bacterias y antibióticos

a la vez; generándose resultados de calidad en cuanto a validez y tiempo de reacción (416, 417).

Esta técnica supone una gran ventaja sobre la **nefelometría** y la **turbidimetría** que permiten llevar a cabo un antibiograma rápido basado en la evaluación de la transmisión y la dispersión de la luz a través del medio, respectivamente. El sistema UroQuick o HBandLTM (Alifax, Padova, Italia), diseñado para la evaluación de muestras de orina, detecta la presencia de microorganismos mediante medidas de dispersión de la luz en el medio de cultivo. Los datos recogidos por los sensores son procesados por un programa informático que monitoriza las curvas de crecimiento. Este equipo ha sido aplicado con éxito para realizar la detección de diversos mecanismos de resistencia de cepas caracterizadas genéticamente o fenotípicamente, requiriendo 24 horas para bacterias Gram-positivas y ocho horas para bacterias Gram-negativas (418).

Con la finalidad de obtener un test rápido basado en crecimiento, también se han adaptado técnicas como el **ensayo de vitalidad** con SYBR Green y yoduro de propidio (PI) (419, 420) en bacterias como *Borrelia burgdorferi*. En este caso se incuban las muestras con diferentes concentraciones de antibiótico y luego se determina la ratio de fluorescencia verde/rojo y se determina la CMI (421).

Otro ejemplo es la aplicación del **analizador de gotas de milifluidos** (MDA) que realiza una monitorización precisa de la dinámica de una población microbiana generando multitud de gotas. La primera aplicación consistió en la medición de la ratio de crecimiento de una cepa que contiene una proteína indicadora

fluorescente y la determinación de la CMI para cefotaxima incubando la bacteria con un gradiente de concentración de este antibiótico. La evaluación de la actividad celular se basa en la detección automática de una señal de epifluorescencia que permite la monitorización de poblaciones bacterianas de hasta un millón de células (422).

4.3.2. Antibiogramas basados en el análisis de parámetros bioquímicos, metabólicos o fisiológicos.

Se han desarrollado algunos test de sensibilidad de modo experimental, que se basan en la capacidad que poseen los antibióticos para provocar afectación o no de ciertos parámetros como NADH y FADH, pH, calor, potenciales de membrana o electrofisiología celular, que se comportan como señales bioquímicas del metabolismo celular activo (423). En algunos casos, también dependen del crecimiento bacteriano.

Existen múltiples **técnicas colorimétricas**, basadas en la observación de cambios de color en el medio de cultivo. Una de las metodologías más extendidas en el uso de resazurina. Cuando el medio de cultivo es suplementado con antibiótico y resazurina, se observa un color azul intenso. Si las bacterias son resistentes al antibiótico, la resazurina es reducida a resafurina y el intenso color azul, cambia a rosa. Por el contrario, si la población bacteriana es sensible el antibiótico, se detendrá el metabolismo y la resazurina permanecerá en su forma oxidada, y el medio mantendrá su color azul. Además de la propia evaluación del cambio de color, una de las mayores limitaciones de esta técnica es que la resazurina no es metabolizada por Gram-negativos no fermentadores (415, 424).

Además de metodologías genéricas como la que se acaba de describir, la colorimetría también se puede aplicar para detección de resistencias concretas. Este es el caso del β LACTA test (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Se trata de una prueba colorimétrica cualitativa usada para la detección de cepas con susceptibilidad reducida a las cefalosporinas de tercera generación. Se basa en la capacidad de las enterobacterias para hidrolizar una cefalosporina cromogénica (HMRZ-86). Este test muestra una sensibilidad del 75% y una especificidad del 100% para la detección de resistencias a cefalosporinas de tercera generación (BLEE, tipo AmpC, KPC y MBL) (425).

Cuando en una reacción química, una molécula excitada, vuelve a su estado fundamental, emite luz, en un proceso denominado **quimioluminiscencia**. Esta particularidad puede ser empleada para detectar resistencias a antibióticos si añadimos al medio un compuesto denominado menadiona. Esta molécula, una vez que se encuentra en el interior celular, es reducida, generándose diversos compuestos que difunden al medio extracelular, donde se oxidan y emiten fotones de luz. El estudio de sensibilidad se lleva a cabo comparando la emisión que se produce en una alícuota del cultivo sin antibiótico, con otra donde sí se ha añadido. Cuando ambas emisiones son muy similares estaremos ante una cepa resistente y cuando la emisión es inferior al cultivo control sin antibiótico, la cepa será sensible (424). Esta técnica puede detectar cepas resistentes a vancomicina en *S. aureus* en 8 horas (426).

La **bioluminiscencia** es una forma de quimioluminiscencia que se produce como consecuencia de una reacción química que tiene lugar

en algunos seres vivos. Uno de los ejemplos más estudiados es el de las luciérnagas, donde la luciferina es oxidada en presencia de adenosín trifosfato (ATP), por la luciferasa, emitiendo luz (415). La cantidad de luz producida es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la reacción. Los antibiogramas se basan en la medida de los niveles de ATP intracelular, extracelular o total, comparando la señal obtenida del grupo control (bacterias crecidas en ausencia de antibiótico) con la recibida de los cultivos del mismo microorganismo en presencia de antibiótico (427, 428). En el caso de estar ante cepas sensibles, cuando se evalúa el ATP intracelular o el ATP total, se observa una disminución de la señal de bioluminiscencia respecto al control; sin embargo, cuando se mide el ATP extracelular, se produce un aumento de dicha señal (429–431). En caso de estar ante una cepa resistente, las medidas obtenidas del grupo control y el tratado, serán muy similares. Un ejemplo comercial de este tipo de ensayos, enfocado en la detección de resistencia a β -lactámicos, es D-Bluco, un test basado en bioluminiscencia que detecta una amplia gama de β -lactamasas a nivel femtomolar. Puede detectar de 10^2 a 10^3 UFC/ml de enterobacterias productoras de β -lactamasas en muestras de orina, en 30 minutos (432).

La bioluminiscencia también puede ser empleada para monitorizar el crecimiento bacteriano, usando bacteriófagos recombinantes que producen luz cuando se activa la expresión del gen luciferasa una vez que infectan a un huésped bacteriano específico (433–435).

Otras técnicas se basan en la **calorimetría**. Esta es una metodología altamente sensible y útil que permite medir la cantidad

de calor generado por los procesos biológicos en células vivas. Los microorganismos de importancia médica, tales como los estafilococos, cuando se replican en un medio de cultivo apropiado, dan lugar a un incremento exponencial de calor que puede ser medido a tiempo real. Cuando una bacteria es sensible a un antibiótico, este inhibe su crecimiento; y por consiguiente, no se producirá un aumento del calor emitido por el cultivo, es por ello que la calorimetría se podría utilizar para detectar resistencias (436). Un ejemplo de ello es una técnica desarrollada para evaluar resistencias a meticilina en *S. aureus*, que tiene un tiempo de preparación de las muestras de 15 minutos, una incubación de 5 horas y un coste muy bajo. Pese a su gran interés todavía no se ha incorporado a la práctica clínica (437).

Otra metodología que se está intentando utilizar para estudiar resistencias es la **dielectroforesis**. Este método se ha descrito como un marcador rápido de muerte celular basado en la detección de cambios en la electrofisiología de la célula causados por la administración de un antibiótico. En contraste con otros marcadores, la electrofisiología de las células cambia rápidamente durante la muerte celular, permitiendo distinguir las células vivas de las muertas (o profundamente dañadas) sin necesidad de hacer un cultivo. Se ha establecido para polimixina B, generando resultados en una hora tras realizar el aislamiento (438).

El **análisis electrofísico** de células bacterianas es muy prometedor, ya que genera información sobre las células metabólicamente activas en un corto periodo de tiempo (439). Un ejemplo es un ensayo realizado con un resonador piezoeléctrico basado en niobato de litio con un campo eléctrico lateral, empleado

para evaluar los efectos de amoxicilina y polimixina. El análisis se realizó directamente en fase líquida. Se demostró que cuando se añade un antibiótico, las frecuencias de las partes real e imaginaria de la impedancia eléctrica del resonador cargado con una suspensión de células sensibles difiere en gran medida de las del resonador cargado con una suspensión de células de control sin antibiótico. El tiempo de análisis no fue superior a 10 minutos (440, 441).

Otra herramienta que se está utilizando para la detección de resistencias es la **espectroscopía**. La espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) se ha aplicado para diferenciar cepas bacterianas sensibles de resistentes, debido a que la variación en la composición bioquímica de la pared celular entre las distintas cepas, permite detectar variaciones en su perfil espectral (442). Esta técnica se ha utilizado ya para *S. aureus* resistente a meticilinas, *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos, *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus* resistentes a vancomicina y *Neisseria gonorrhoeae* (443).

La ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo), es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas). La aplicación más simple de MALDI-TOF MS es analizar colonias de bacterias o levaduras sin preparaciones previas, proporcionando una identificación rápida con un coste reducido (444). En algunos casos, la detección de un producto génico puede ser relacionada de manera potencial con resistencia a uno o más antibióticos (445). Varios estudios

han descrito la detección de la degradación de antibióticos β -lactámicos mediante espectrómetro de masas (446–448). La hidrólisis enzimática del agente antimicrobiano da lugar a un cambio de masa de 18 Da que puede ser detectado por MALDI-TOF-MS. Se demostró que este método tiene una sensibilidad del 97% y una especificidad del 98% (448) aportando los resultados en entre 1 h y 2,5 h (446). Hay otros muchos estudios que apoyan que MALDI-TOF permite discriminar entre cepas sensibles y resistentes a ciertos antibióticos en particular (424).

Otros estudios que se centran en el uso de aparatos habituales en los laboratorios, para detectar resistencias, como es el caso del **citómetro de flujo** (449). Esta técnica consiste en la formación de un flujo de partículas, generalmente células, ordenadas en fila con una intensidad de entre 500 y 4.000 partículas/segundo. El alineamiento posibilita medir varias características de la misma célula a la vez, lo que permite caracterizar, separar y cuantificar distintas subpoblaciones. Además, utilizando diversos fluorocromos se pueden estudiar diversos parámetros bacterianos (potencial de membrana, tamaño celular, actividad enzimática, integridad de la membrana, tamaño celular y concentración microbiana) que aportan información sobre la sensibilidad a los antibióticos (424). Se ha demostrado que se puede emplear para desarrollar un test que permita determinar sensibilidad a determinados antibióticos en menos de 3 horas. Para ello se busca un valor de corte utilizando cepas de susceptibilidad conocida, a las que se incuba con el antibiótico y posteriormente se analizan en el citómetro de manera que se llega a establecer un valor

que será el utilizado para la determinación de resistencias a los antibióticos (450).

4.3.3. Test rápidos basados en técnicas de genética molecular.

Actualmente, en los laboratorios clínicos de bacteriología se están llevando a cabo gran cantidad de cambios. Ya se dispone de una multitud de paneles basados en técnicas moleculares para la detección e identificación de bacterias y la evaluación de marcadores de resistencia (444). Algunas de estas técnicas también pueden ser utilizadas para evaluar el crecimiento bacteriano.

Estos test se presentan como métodos efectivos y directos que eliminan los cultivos laboriosos, las incubaciones largas, las posibilidades de contaminación y la diseminación de infecciones peligrosas (451). Se les atribuye también ser rápidos, directos, sensibles y específicos en la detección de genes de resistencia. Sin embargo, tienen una serie de desventajas: la necesidad de un ensayo específico para cada agente antimicrobiano, solo se pueden detectar determinados genes de resistencia que con frecuencia están mutados, tienen baja sensibilidad para pacientes con infecciones latentes donde prácticamente no hay microorganismos presentes en la muestra, todavía no se han definido todos los perfiles de resistencia de todas las bacterias, son necesarios reactivos y equipamiento de alto coste y se necesita personal especializado (415).

Entre estas técnicas podemos destacar la PCR, tanto convencional como a tiempo real o RT-PCR, chips, secuenciación,

microarrays y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (452, 453).

La cinética de crecimiento de la bacteria puede determinarse de manera más ajustada por la cuantificación del número de copias de ADN. La **PCR** es más rápida y más específica que el cultivo bacteriano; usando ciclos cortos y asumiendo una buena eficiencia de la PCR, el ADN se duplica 40 veces más rápido que la bacteria (454). Se ha descrito un método universal para medir el efecto inhibitorio de agentes antimicrobianos en los patógenos bacterianos comunes, empleando cebadores universales y determinando el número de copias de ADN utilizando el sistema LightCycler. Para ello, se cuantifican las copias de ADN de 16S rRNA o de *rpoB* en distintos momentos de una incubación en presencia o ausencia del antibiótico. Se estipuló que los mejores resultados se obtienen en 2 horas para Gram-negativos y 4 horas para Gram-positivos (455).

Los test genéticos de sensibilidad antimicrobiana tienen la posibilidad de reducir el tiempo de detección. A pesar de existir paneles cerrados que cubren los marcadores de resistencias más importantes, cada laboratorio puede personalizar su PCR de resistencias para los patógenos más relevantes y los antibióticos más utilizados en su área de influencia. A diferencia de los test fenotípicos, que pueden confirmar sensibilidad o resistencia independientemente de su mecanismo, el test genotípico únicamente puede detectar la presencia o ausencia de un número limitado de dianas genéticas.

Una herramienta desarrollada en base a la PCR es **LAMP** (loop mediated isothermal amplification). En LAMP los genes de interés se

amplifican a una temperatura constante de 60-65 °C empleando en lugar de la Taq polimerasa, la ADN polimerasa *Bst* debido a la fuerte actividad de desplazamiento de las hebras. Un ejemplo de su aplicación ha sido mediante PCR digital, proporcionando resultados en unos 7 min frente a las dos horas necesarias para un ensayo comercial similar con PCR digital sin emplear LAMP (456). Otro ejemplo es un test desarrollado para detectar resistencias en *E. coli*, para levofloxacino, ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y fosfomicina, donde los valores de sensibilidad y especificidad que se alcanzaron fueron entre 80% y 100% (457).

Los **microarrays** se basan en la detección mediante un análisis de imagen, de la hibridación de moléculas diana a sondas oligonucleotídicas específicas, inmovilizadas en un soporte sólido (415). Los microarrays detectan un gran número de genes de resistencia en un mismo ensayo. Se han comercializado varios microarrays, como el Check-MDR CT102, el Check-MD CT103 y el Check-MDR CT103 XL (Check points Health BV), que permiten detectar un gran número de genes que codifican diferentes β -lactamasas (BLEE, AmpC y carbapenemasas) a partir de colonias crecidas en placas de aislamiento (424). Otro sistema comercial es Verigene (Nanosphere, USA). Verigene incluye dos paneles para identificación bacteriana, BC-GN que detecta ocho dianas de bacterias Gram-negativas y seis marcadores de resistencia, y BC-GP que detecta doce dianas y tres marcadores de resistencia en Gram-positivos. Los cartuchos de Verigene consisten en un portaobjetos de cristal (microarray) y la tecnología asociada que es capaz de identificar y

cuantificar secuencias de ácidos nucleicos, sin un paso de amplificación por PCR inicial (423).

El desarrollo de estos test es un tema de vanguardia, y como tal, se están incorporando herramientas nuevas para el desarrollo de test moleculares como CRISPR. Basada en ella y combinada con microfluídica, se desarrolló la plataforma **CARMEN** (Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids; Reacciones combinatorias dispuestas para la evaluación multiplexada de ácidos nucleicos) (458) destinada a la detección de virus. Posteriormente se diseñó una modificación, denominada bCARMEN, la cual es capaz de detectar y discriminar 52 especies bacterianas clínicamente relevantes y varios genes clave de resistencia a los antibióticos. De modo complementario, se desarrolló un flujo de trabajo simple, utilizando reactivos estabilizados y una lectura óptica con una cámara fotográfica de un teléfono móvil, lo que abre la posibilidad de una rápida identificación de patógenos y pruebas de susceptibilidad a los antibióticos en el lugar de atención (459).

En relación con las técnicas de genética molecular, también se está evaluando el uso de secuenciación masiva, de próxima generación, aunque quedan varias cuestiones por resolver y no está clara su utilidad como sistema rápido (460, 461).

El desarrollo de test rápidos de sensibilidad antimicrobiana, es un tema candente que continúa en pleno desarrollo.

Objetivos

El propósito global de este trabajo es el desarrollo de test rápidos, fiables y eficaces, basados en determinaciones de parámetros fenotípicos simples, visualizados mediante microscopía, que permitan la detección de resistencias a distintos tipos de antibióticos en microorganismos de gran patogenicidad.

Para ello nos planteamos las siguientes cuestiones de las que se derivan los objetivos a desarrollar:

1. En relación a antibióticos cuya diana es el ADN bacteriano (quinolonas), ¿es posible determinar si la quinolona es efectiva (en cepas sensibles) o no (en cepas resistentes), mediante la simple visualización directa de su diana, esto es, la valoración de la integridad del nucleoide?

1.1. Diseño de un protocolo técnico genérico simplificado, para la determinación rápida de sensibilidad/resistencia a quinolonas en células individuales de patógenos Gram-negativos.

2. En relación con antibióticos que afectan el peptidoglicano, ¿es posible estimar si un antibiótico de pared (β -lactámico carbapenémico) es efectivo (en cepas sensibles) o no (en cepas resistentes), mediante visualización directa de la integridad de la pared? ¿Cómo es posible discernir si la pared celular bacteriana ha sido afectada o no por el antibiótico?

2.1. Implementación de un protocolo que permita diferenciar de modo rápido cepas sensibles y resistentes de *A. baumannii* a quinolonas (mediante el parámetro: integridad del ADN bacteriano) y a carbapenémicos (mediante el parámetro: integridad de la pared celular).

2.2. Validación las técnicas propuestas, empleando una colección de cepas clínicas y cálculo de los índices de validez para ambas.

3. En relación con antibióticos que afectan la membrana plasmática (colistina), aunque la diana de la colistina no es ni el ADN ni la pared celular, ¿es posible que estos sean dañados secundariamente? ¿Puede la evaluación de la integridad del ADN bacteriano y/o la integridad de la pared celular discriminar de modo rápido la de sensibilidad/resistencia a colistina?

3.1. Realización de experimentos de dosis-respuesta sobre el ADN y sobre la pared, con diferentes concentraciones de colistina en cepas de *A. baumannii* de CMI conocida, sensibles y resistentes.

3.2. Establecimiento de las dosis de colistina que permitan evaluar la sensibilidad/resistencia a este antibiótico en *A. baumannii*; y comparación con los puntos de corte utilizados en los antibiogramas estándar basados en crecimiento.

3.3. Determinación del valor de corte, de cada uno de los parámetros estudiados, que permita discriminar entre cepas de *A. baumannii* sensibles y resistentes a colistina con la mayor sensibilidad y especificidad y validar con una colección de cepas.

4. La ceftazidima es una cefalosporina que afecta la síntesis del peptidoglicano, especialmente a nivel del septo de división celular. ¿Puede la simple evaluación del cambio en la morfología celular usarse como parámetro para estimar de modo rápido la sensibilidad/resistencia a ceftazidima en patógenos Gram-negativos?

4.1. Establecimiento de la dosis de corte de ceftazidima que permite discernir entre cepas sensibles y resistentes a dicho antibiótico en *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* y *P. aeruginosa*; y comparación con los puntos de corte empleados en los antibiogramas clásicos.

4.2. Validación de la técnica diseñada en un amplio número de cepas clínicas y comparar los resultados obtenidos con los de los antibiogramas estándar, calculando así sus índices de validez.

5. En relación con antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas bacteriana, en ciertos patógenos Gram-positivos, es posible inducir experimentalmente una respuesta autolítica rápida. ¿Es dicha respuesta dependiente de la síntesis proteica?

Si ello es cierto, ¿puede dicha respuesta ser empleada como parámetro para la determinación rápida de sensibilidad/resistencia a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas en *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae*?

- 5.1. Establecimiento de un protocolo experimental que permita visualizar la respuesta lítica en *E. faecalis* y *S. pneumoniae*.
- 5.2. Determinación de las dosis de corte de eritromicina y doxiciclina que permiten discernir entre cepas sensibles y resistentes en *E. faecalis*.
- 5.3. Determinación de las dosis de corte y el efecto cuantitativo sobre la respuesta lítica de azitromicina, eritromicina y doxiciclina, que permiten discernir entre cepas sensibles y resistentes en *S. pneumoniae*.
- 5.4. Cálculo de los índices de validez de la técnica enfrentando los resultados obtenidos con los de los antibiogramas estándar.

6. En relación con antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas bacteriana, en ciertos patógenos Gram-negativos, ¿es el alargamiento celular inducido por mitomicina C (MMC) una respuesta rápida dependiente de la síntesis de proteínas? Si eso es correcto, ¿puede esa respuesta ser empleada como parámetro

para determinación rápida de sensibilidad/resistencia a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas en patógenos Gram-negativos?

- 6.1. Establecimiento de una metodología que permita evaluar la elongación celular inducida por MMC en *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.
- 6.2. Estudio del efecto de los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas sobre la elongación celular causada por MMC.
- 6.3. Determinación de la dosis de corte de los antibióticos empleados, que permite discriminar entre cepas sensibles y resistentes a los mismos y comparación con los puntos de corte empleados en los antibiogramas estándar basados en la evaluación del crecimiento.
- 6.4. Realización de un estudio de validación con cepas clínicas que permita establecer la sensibilidad y especificidad de cada uno de los protocolos establecidos.

Desarrollo de la actividad experimental

En el 2003 se patentó el test de la dispersión de la cromatina espermática (Sperm Chromatin Dispersion; SCD). Permite identificar aquellos espermatozoides que tienen su material genético (ADN) fragmentado, con aplicación directa en reproducción, tanto humana como animal. Esta técnica se ha acomodado muy bien a los laboratorios de andrología y de reproducción asistida por su sencillez y rapidez (462).

Su base técnica reside fundamentalmente en dos hechos. El primero es que las cadenas de ADN que contienen roturas son más fáciles de desnaturalizar, puesto que estas roturas ya sean de cadena doble o de cadena sencilla son orígenes para la desnaturalización cuando se someten a un tratamiento ácido. El segundo hecho, consiste en que los bucles de cromatina están formados por ADN y proteínas. Por ello, cuando se someten a una solución desproteinizante, se desempaquetan al extraer las proteínas y dan lugar a halos periféricos de bucles de ADN que surgen desde el núcleo residual.

El protocolo comienza con la inclusión de las células espermáticas en una matriz de agarosa. Esta mezcla se deposita sobre un portaobjetos previamente tratado, se coloca un cubreobjetos y se enfría en nevera, de tal manera que se forma una fina película con las células retenidas, intactas, sin fijación, manteniendo su estructura tridimensional. A continuación, se someten a un proceso de desnaturalización ácida controlada, seguido de un tratamiento con lisis específica y se lavan en agua destilada para eliminar todos los restos de la solución desproteinizante. Para terminar el proceso, los portaobjetos se someten a una batería de alcoholes de concentración creciente para deshidratarlos. Una vez secos, el microgel forma una

película adherida al portaobjetos, con los espermatozoides en el mismo plano; estos se tiñen, ya sea con Wright para microscopía de campo claro o con DAPI para microscopía de fluorescencia.

Cuando observamos las células, podemos diferenciar claramente dos regiones: una central formada por la estructura residual del núcleo a la que llamamos *core* y otra periférica formada por los bucles de ADN, que se denomina halo. Los espermatozoides con ADN fragmentado no muestran halos o son muy pequeños, mientras que los espermatozoides sin fragmentación liberan halos de gran tamaño (figura 16a). El índice de fragmentación, calculado como el tanto por ciento de células con el ADN fragmentado en la muestra seminal, se utiliza como uno de los parámetros indicativos de la calidad del semen (463). Esta técnica permite detectar fragmentación global en el espermatozoide, es decir, dependiente de roturas de cadena simple y/o de cadena doble, de manera conjunta. Una modificación del protocolo, obviando el paso de desnaturalización y ajustando las condiciones de lisis, permite visualizar únicamente las roturas de doble cadena. De esta manera, si llevamos a cabo ambas metodologías sobre una misma muestra podremos discriminar el porcentaje de fragmentación debido a roturas de doble cadena e indirectamente el porcentaje de fragmentación atribuible a roturas de cadena sencilla exclusivamente (figura 16b) (464).

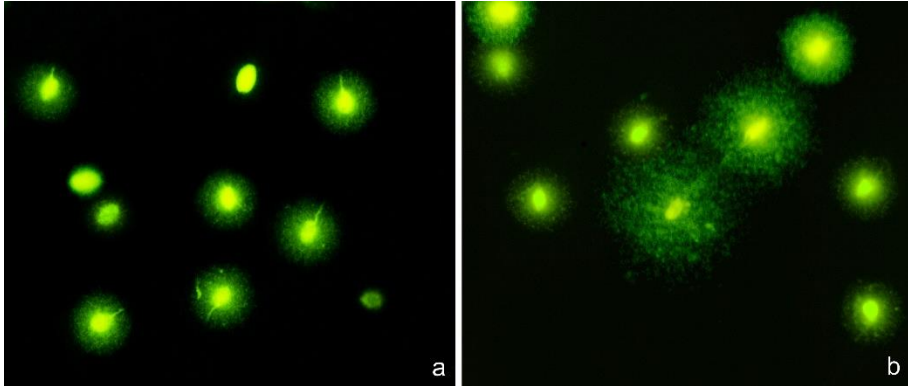


Figura 16. Muestras de semen humano procesadas mediante el test SCD para determinar la fragmentación del ADN espermático, ya sea con SSBs o DSBs **(a)**, y mediante el test SCD modificado para visualizar espermatozoides con ADN fragmentado debido a DSBs **(b)**. Tras el test SCD, los espermatozoides con el ADN fragmentado, tanto con SSBs como con DSBs, no muestran halo de dispersión de la cromatina o este es pequeño. Cuando se utiliza el ensayo SCD modificado, los espermatozoides con ADN fragmentado a causa de DSBs presentan grandes halos de dispersión formados por pequeños fragmentos de ADN (464).

La resistencia antibiótica es un grave problema de salud mundial, y una de las mejores herramientas de las que disponemos para luchar contra ella, es el uso racional y correcto de los antibióticos. Para ello es imprescindible tener la información de la sensibilidad bacteriana a la hora de pautar un antibiótico. Sin embargo, los antibiogramas tradicionales requieren de largos periodos de incubación, por basarse en el crecimiento bacteriano, habitualmente tardando entre 16 y 24 horas tras el aislamiento e identificación de la bacteria. Esto obliga a realizar tratamientos empíricos, que en ocasiones no son adecuados. Por ello, sería de gran utilidad obtener resultados de un antibiograma en unas pocas horas.

Son muchos los esfuerzos que se están destinando a este tema, y múltiples las técnicas que se tratan de implementar. En este contexto, surgió la idea de desarrollar una técnica que permitiese valorar el efecto de los antibióticos que afectan al ADN, a través de un protocolo basado en el test SCD, para espermatozoides. Así en 2008, se desarrolló una adaptación del ensayo basado en difusión que permite una discriminación sencilla entre bacterias con ADN fragmentado y sin fragmentar. Las células intactas se incluyeron en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos, se incubaron en un tampón para lisar parcialmente las paredes celulares, membranas y proteínas, y luego el ADN se tiñó con un fluorocromo de alta sensibilidad, SYBR Gold. Al microscopio de fluorescencia, las bacterias con el ADN fragmentado se identifican como aquellas que presentan una difusión periférica de fragmentos de ADN a partir del centro residual, mientras que aquellas sin fragmentación del ADN, sólo muestran una extensión limitada de los bucles de fibras de ADN, o nucleoide. Estos resultados se han visto en varias especies de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como en levaduras. Dado que las fluoroquinolonas inducen múltiples roturas de la doble cadena del ADN bacteriano, la incubación con fluoroquinolonas a dosis muy elevadas sirvió como modelo para confirmar la detección de la fragmentación del ADN mediante la técnica de difusión (465).

Dada la efectividad de la técnica, en 2009 se llevó a cabo un estudio sobre la evaluación del efecto del ciprofloxacino (quinolona) en el ADN cromosómico de *E. coli*, con el fin de establecer un protocolo lo más simple posible para su traslación a la clínica. Primeramente, se incubó la cepa TG1 con dosis crecientes de ciprofloxacino durante

40 min. Tras realizar el ensayo basado en difusión, se observó fragmentación en el ADN desde la dosis correspondiente a la CMI, aumentando progresivamente los fragmentos y su nivel de difusión con la dosis del antibiótico (466). Tras comprobar la eficacia del ensayo para la detección del efecto del ciprofloxacino, surgió el kit Micro-Halomax para microscopía de fluorescencia (Halotech DNA SL, Madrid, España). Empleando este kit, se realizó un trabajo en el que se evaluó la sensibilidad/resistencia a ciprofloxacino en cerca de un centenar de cepas diferentes de *E. coli*, obteniéndose un 100% de sensibilidad y especificidad en relación con el antibiograma estándar (467). De esta manera quedó patente que se pueden desarrollar test de detección de resistencia a quinolonas rápidos y eficaces, con la sencilla evaluación del estado del ADN, la diana específica del antibiótico. Se ensayaron diferentes quinolonas en múltiples cepas de diferentes microorganismos Gram-negativos, con resultados similares.

Los antibióticos más utilizados en la práctica clínica son los que afectan a la síntesis del peptidoglicano. Ante la misma necesidad de disponer de test rápidos de sensibilidad para este tipo de antibióticos surgió la posibilidad de adaptar el kit de difusión para evaluar el estado de la pared celular. En el caso de los antibióticos que afectan el ADN es necesario lisar todas las bacterias para que liberen su nucleóide y poder visualizar la integridad o no, en cada célula. En el caso de los antibióticos que afectan a la pared bacteriana, las bacterias que son sensibles, van a tener alterada la síntesis del peptidoglicano y, por consiguiente, la estructura de la pared celular. En consecuencia, se planteó la hipótesis de que se podría evaluar la integridad de la pared bacteriana incubando con una solución de lisis más suave que la

utilizada para evaluar la integridad del ADN, la cual podría lisar únicamente las paredes que se encontrasen debilitadas, manteniendo intactas las de las células que no han sido afectadas por la acción del antibiótico.

Para ello, las células incubadas previamente con antibiótico de pared a una concentración equivalente al punto de corte de sensibilidad del CLSI, se incluyeron en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y se incubaron brevemente con una solución de lisis adaptada. Tras el lavado y deshidratación, se tiñeron con el fluorocromo de ADN, SYBR Gold para su observación bajo microscopía de fluorescencia. Se observó que la lisis afecta a las células de manera diferencial, dependiendo de la integridad de la pared. Si la bacteria es sensible al antibiótico, la pared celular debilitada se ve afectada por la solución de lisis, por lo que el ADN del nucleóide contenido en el interior de la bacteria se libera y difunde. Alternativamente, si la bacteria es resistente al antibiótico, la pared prácticamente no se ve afectada por la solución de lisis y no se libera el nucleóide, conservando su aspecto morfológico normal. En una aproximación inicial, se realizó un experimento de dosis-respuesta con una cepa de *E. coli* sensible a ampicilina y se observó un ligero efecto antes de la dosis correspondiente a la CMI. Sin embargo, el nivel de daño se incrementó a medida que aumentaba la dosis de manera paulatina. También se evaluaron 46 cepas clínicas de ocho especies Gram-negativas y cuatro Gram-positivas para determinar su sensibilidad o resistencia a penicilina, ampicilina, ceftazidima o vancomicina, confirmando la aplicabilidad de la metodología (468).

A. baumannii es un Gram-negativo de muy alta patogenicidad, que desarrolla múltiples resistencias a nivel hospitalario, por lo que es de gran interés desarrollar test rápidos de detección de resistencias. Además de la quinolona ciprofloxacino, uno de los tratamientos más utilizados son los carbapenémicos, como el meropenem. Disponiendo de un amplio cepario gracias al apoyo del Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), nos planteamos diseñar un protocolo que permita discriminar cepas de *A. baumannii* sensibles, intermedias y resistentes a ciprofloxacino y a meropenem. Con esa intención, se pusieron a punto las condiciones de incubación y dosis de corte y se validó en ensayo para los diferentes antibióticos.

Muchas de las cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos o multirresistentes son tratadas con colistina, la cual se intenta mantener como antibiótico de última opción. Este antiguo antibiótico, pertenece a la familia de las polimixinas y actúa alterando la estabilidad de la molécula del lipopolisacárido, provocando la ruptura de la membrana celular externa, alterando la permeabilidad celular. Nos propusimos valorar la eficacia de los ensayos de daño del ADN y de la pared celular, para determinar resistencia a colistina en cepas de *A. baumannii*. Ni el ADN ni la pared celular son las dianas primarias de la colistina. Aun así, sí se detectó fragmentación del ADN y daño en la pared, posiblemente secundario durante el proceso de muerte celular. Estos fenómenos no ocurren en la totalidad de las células, como habíamos visto en los otros test. Es por ello que en este caso el test no es cualitativo sino cuantitativo y fue necesario explorar la concentración de colistina y la fracción de bacterias con daño en el

ADN o en la pared celular que permitan distinguir cepas sensibles de resistentes de modo óptimo.

Se sabe que las células bacterianas de muchas especies, tras ser sometidas a un proceso de estrés, pueden llegar a adoptar forma filamentosa. Parece que se trata de una estrategia de protección en la que se detiene el crecimiento bacteriano, mientras se produce una expansión continua del volumen celular. Este mecanismo de defensa es utilizado también frente algunos antibióticos.

Teniendo en cuenta todo esto, se pensó que la simple observación de la morfología celular tras la incubación con un antibiótico inhibidor de la síntesis del peptidoglicano podría ser suficiente para desarrollar un test más rápido que el de lisis celular que permitiese detectar cepas resistentes a este tipo de antibióticos.

En ocasiones para tratar infecciones causadas por Gram-negativos se utiliza ceftazidima, una cefalosporina que actúa inhibiendo el paso final de la transpeptidación necesario para la síntesis del peptidoglicano. Parece ser que el peptidoglicano del septo es una diana preferente. Nos propusimos evaluar si las bacterias sensibles a ceftazidima verían alterada su división celular tras el tratamiento, aumentando su longitud, al no realizar una correcta septación. Se comprobó que la simple observación de la morfología celular es discriminativa de la sensibilidad/resistencia. Las cepas resistentes no se alargan o lo hacen en un nivel muy discreto, lo que permitió diseñar un protocolo en *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, obteniéndose unos resultados concordantes con los antibiogramas estándar. Sin embargo, es importante destacar que el

parámetro “alargamiento celular” y el de “inhibición del crecimiento”, aunque positivamente correlacionados, muestran diferente dosis de corte, que incluso varía en cada especie.

Finalmente, los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas son ampliamente utilizados tanto para Gram-positivos como para Gram-negativos. Algunas especies de Gram-positivos son capaces de activar vías autolíticas bajo determinadas situaciones. Por ejemplo, *S. pneumoniae* lisa su pared celular tras añadirle detergentes como deoxicolato o Tritón X-100, a través de la activación de la autolisina LytA. Las autolisinas también están implicadas en la rotura de la pared de *E. faecalis* tras aplicar lisozima. Esta respuesta autolítica es independiente de su actividad muramidasa y depende de su carácter catiónico. Se había descrito que la aplicación de altas dosis de cloranfenicol interfiere en la actividad autolítica de LytA en *S. pneumoniae*, de lo que se puede extrapolar que esta actividad está influida por la síntesis de proteínas y su evaluación podría discriminar cepas sensibles y resistentes a distintos tipos de antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas (132). Para probarlo, escogimos antibióticos del tipo macrólidos (azitromicina y eritromicina) y la tetraciclina doxiciclina. Tras la incubación con el antibiótico, los cultivos de *E. faecalis* fueron tratados con lisozima y los de *S. pneumoniae*, con una mezcla de tritón-X-100, lisozima y EDTA, para propiciar una respuesta lítica en todo tipo de cepas. Tras procesarlas con una variante del kit Micromax®, las células lisadas se cuantificaron gracias a que presentaban difusión del ADN interior. Se observó que, si la síntesis de proteínas es inhibida por el antibiótico, es decir, si la cepa es sensible, la fracción de células con efecto lítico se reduce en

gran medida frente al control sin antibiótico, mientras que, en el caso de cepas resistentes, donde la síntesis proteica no es inhibida, las variaciones son mínimas.

En el caso de microorganismos Gram-negativos no encontramos ningún efecto directamente observable al microscopio de los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, por lo que nuevamente fue necesario recurrir a un parámetro indirecto que pueda aportar información. La mitomicina C (MMC) es un agente alquilante bifuncional que induce principalmente entrecruzamientos entre las cadenas del ADN. Este estrés genotóxico desencadena una fuerte activación de la respuesta SOS bacteriana. Una de las consecuencias fenotípicas características de la respuesta SOS inducida por MMC es el alargamiento celular. De hecho, se suele emplear como marcador de dicha respuesta.

En general, la respuesta de elongación inducida por MMC relacionada con SOS requiere una activación transcripcional a corto plazo y la consiguiente traducción ribosómica. Por tanto, la inhibición de la síntesis de proteínas evitaría algunos de los resultados de la respuesta SOS inducida, como podría ser el alargamiento. Para ello, exploramos la idoneidad de la evaluación de la elongación celular ligada a la respuesta SOS inducida por MMC como un indicador simple y rápido de susceptibilidad/resistencia a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas gentamicina, tobramicina y tigeciclina, en infecciones por los Gram-negativos *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Para ello se realizaron incubaciones con MMC precedidas de antibiótico o control sin el mismo. El estudio evidenció que la inhibición de la síntesis de proteínas previene la

elongación causada por MMC en las cepas sensibles; estableciendo un protocolo que permite diferenciar cepas sensibles y resistentes en menos de tres horas y con una sensibilidad y especificidad cercanos al 100%.

Capítulo I

**Detección rápida de sensibilidad o
resistencia bacteriana a quinolonas**

Resumen:

La aparición de microorganismos multirresistentes, junto con el declive en el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos, es un motivo de gran preocupación para la política sanitaria. En este contexto alarmante, una terapia antibiótica temprana y bien adaptada es una estrategia importante no sólo para mejorar los resultados clínicos, sino también para evitar la aparición y diseminación de cepas peligrosas resistentes. Una de las clases de antibióticos más comunes son las fluoroquinolonas. Atrapan a la ADN girasa y/o la topoisomerasa IV en el ADN, lo que provoca la fragmentación del ADN. Hemos desarrollado el ensayo Micromax® para determinar, *in situ*, la integridad del ADN de los microorganismos. Se validó como un procedimiento sencillo para la evaluación rápida de la sensibilidad o resistencia a quinolonas en bacterias Gram-negativas. Tras la incubación con la quinolona, las células se incluyen en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y se incuban con una solución de lisis específica para retirar la pared celular y visualizar los nucleoides bajo microscopía de fluorescencia. Si la cepa es sensible a la quinolona, los nucleoides bacterianos mostrarán un halo difuso de puntos formado por fragmentos de ADN, mientras que, en las cepas resistentes aparecerán intactos. El proceso técnico se lleva a cabo en 40 min con una sensibilidad y especificidad prácticamente totales.

1. Introducción:

La aparición y propagación de cepas patógenas resistentes a los antibióticos se considera una de las mayores amenazas para la salud humana. El Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC)

declaró 25.000 muertes anuales causadas por patógenos multirresistentes. Este problema se acentúa por el actual declive en el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos (469). Los microorganismos resistentes a múltiples antibióticos representan un riesgo para la salud en continuo aumento, sobre todo en el marco clínico. En concreto, los pacientes inmunodeprimidos e ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos corren el riesgo de contraer enfermedades infecciosas nosocomiales que pueden ser resistentes a uno o más antibióticos. En este caso, los pacientes pueden adquirir infecciones a través de medios clínicos invasivos, pero necesarios, tales como, infecciones de las vías respiratorias durante ventilación mecánica, en el trato urinario o los vasos sanguíneos a través de catéteres o incluso a través de heridas en la piel, como las incisiones necesarias para múltiples procedimientos médicos. Este tipo de infecciones puede estar asociado con una alta tasa de mortalidad. Los patógenos más habituales son bacilos Gram-negativos, a menudo resistentes a varios antibióticos, como, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y algunas enterobacterias como *Escherichia coli* (24).

Un tratamiento antibiótico temprano, bien seleccionado, proporciona la mejor defensa contra estos patógenos multirresistentes. Los procedimientos actuales requieren un cultivo bacteriano para la identificación del microorganismo, seguido de un antibiograma, pudiéndose necesitar 2-3 días de crecimiento bacteriano. El paso de cultivar la bacteria para hacer un antibiograma generalmente necesita sobre un día de incubación y se suele basar en la determinación de la

concentración mínima inhibitoria del crecimiento bacteriano por el antibiótico (393).

Dado el tiempo relativamente largo que se necesita para realizar el antibiograma estándar, se suelen administrar antibióticos empíricamente, al comienzo de infecciones nosocomiales potencialmente peligrosas para la vida. Esta primera línea de defensa se basa con frecuencia en antibióticos cuya efectividad se conoce sobre el probable patógeno implicado. Sin embargo, estos tratamientos pueden ser ineficaces en un 20-40% de los casos, y un cambio de antibiótico en momentos posteriores puede llegar a tener una probabilidad de éxito reducida. Además, el uso incorrecto o abusivo de los antibióticos puede dar lugar a un aumento de cepas resistentes. Un antibiograma rápido es un gran cambio, que puede salvar vidas y reducir los costes de la asistencia sanitaria. Además, puede permitir prevenir la dispersión de cepas peligrosas resistentes, así como preservar algunos antibióticos estratégicos, que a veces son la única opción terapéutica (470-473).

Entre los antibióticos más habitualmente prescritos destacan las fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, norfloxacino, o moxifloxacino. Estos antibióticos se unen a las ADN topoisomerasas unidas al ADN, la ADN girasa, y/o la topoisomerasa IV, siendo la ADN girasa la diana preferente en las bacterias Gram-negativas. Esta unión da lugar a complejos ternarios de quinolona-topoisomerasa-ADN. Tras la formación del complejo ternario, la topoisomerasa produce una rotura de doble cadena en el ADN, pero la quinolona unida inhibe la posterior reunión de los extremos del ADN debido a la captura de la topoisomerasa. Estos complejos de escisión se distribuyen por todo el

cromosoma bacteriano, dando lugar a la fragmentación del ADN y la posterior muerte celular (176, 177).

La resistencia a fluoroquinolonas está aumentando a nivel mundial, siendo de gran preocupación para las políticas sanitarias. El mecanismo de resistencia más habitual es la modificación de la diana por mutaciones en los genes que codifican las subunidades de la ADN girasa y/o la topoisomerasa IV. Además, la concentración intracelular del antibiótico puede estar reducida debido a cambios en la penetración del medicamento o la sobreexpresión de las bombas de expulsión. Un mecanismo de resistencia que cada vez adquiere más peso es la protección de la diana a través de genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (357, 474-476). Estos distintos mecanismos se pueden combinar dando lugar a altos niveles de resistencia. En algunos casos, la resistencia a fluoroquinolonas da lugar a la ausencia o disminución de DSBs letales.

Desarrollamos un procedimiento patentado para determinar, *in situ*, célula a célula, la presencia de fragmentación de ADN en el cromosoma de microorganismos (465-467, 477). Las células se incluyen en un fino microgel inerte sobre un portaobjetos y se incuban en una solución de lisis específica que retira la pared celular, membranas y proteínas. Los nucleoides se tiñen con un fluorocromo de alta sensibilidad y se visualizan bajo microscopía de fluorescencia. Si la célula bacteriana es sensible a la fluoroquinolona, tras la incubación con el antibiótico mostrará el ADN del cromosoma bacteriano con fragmentos. Los fragmentos difundirán desde el nucleoide residual, dando lugar a halos de difusión de puntos de ADN. Cuanto mayor sea la fragmentación, mayor será el número de

puntos de ADN y mayor será la superficie circular de difusión. Por el contrario, si la bacteria es resistente, los nucleoides aparecen intactos o con muy pocos fragmentos de ADN. Hasta este momento, el proceso se ha validado de forma exitosa en 923 aislados clínicos de *Escherichia coli* (n=163), *Acinetobacter baumannii* (n=322), *Pseudomonas aeruginosa* (n=229), *Klebsiella pneumoniae* (n=189), *Klebsiella oxytoca* (n=4), *Enterobacter cloacae* (n=6), *Proteus mirabilis* (n=5) y *Proteus vulgaris* (n=5) (467, 477). El test Micromax® muestra un 99,83% de sensibilidad y 100% de especificidad para determinar resistencia a ciprofloxacino, levofloxacino y norfloxacino.

2. Material

2.1. Reactivos y equipamiento técnico

1. Incubador a 37 °C (con agitación).
2. Baños termostáticos a 90-100 °C y 37 °C.
3. Frigorífico a 4 °C.
4. Horno microondas.
5. Extractor de gases.
6. Microscopio de epifluorescencia con filtro adecuado para SYBR Gold y objetivo 100X.
7. Guantes de látex.
8. Micropipetas y puntas.

9. Lanceta.
10. Tubos de plástico (10 o 15 ml).
11. Placa de microtitulación estéril de 96 pocillos con tapa o tubos tipo Eppendorf de 0,5 ml.
12. Bandejas para incubaciones horizontales.
13. Cubreobjetos de cristal (18x18 mm o 22x22 mm y 24x60 mm).
14. Medios de cultivo: Mueller-Hinton (M-H) líquido y placas de agar M-H.
15. Agua destilada.
16. Etanol 70%, 90% y 100%.
17. Fluoroquinolona.
18. Prototipo Micromax kit® (ABM technologies LLC, Navasota, TX). El kit contiene portaobjetos pretratados, tubos Eppendorf con agarosa de bajo punto de fusión y un frasco con 125 ml de solución de lisis.

2.2. Tinción para microscopía de fluorescencia

1. Tinción de ácidos nucleicos SYBR Gold (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10.000X, diluido en DMSO.
2. Tampón Tris Borato EDTA (TBE) 1X (0,09 M Tris-borato; 0,002 M EDTA; pH 7,5).
3. Solución de tinción SYBR Gold (2,5 µl/ml) en tampón TBE.

3. Métodos

3.1. Cultivo bacteriano e incubación con el antibiótico

Se selecciona una colonia de un cultivo en placa de 16-24 horas y se incuba en 2 ml de medio líquido Mueller-Hinton durante 2 h a 37 °C con agitación (ver nota 1).

Se diluye el cultivo bacteriano en medio líquido hasta alcanzar una concentración de 1×10^8 células/ml. Se puede realizar empleando un espectrofotómetro o un nefelómetro (ver nota 2). Cuando se utiliza un espectrofotómetro, 1×10^8 células/ml son equivalentes a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,1. Cuando se utiliza un nefelómetro, 1×10^8 células/ml equivalen a 0,5 unidades McFarland.

Se realiza la incubación con el antibiótico, empleando una placa de microtitulación estéril de 96 pocillos con tapa, o tubos tipo Eppendorf de 0,5 ml (ver nota 3). Para cada cepa que se va a analizar, se necesitan dos pocillos (o dos tubos): uno para el control sin antibiótico y otro para incubar las bacterias con la dosis de antibiótico correspondiente al punto de corte de sensibilidad, según las indicaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) o del Comité Europeo de Evaluación de la Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST).

Para preparar cada pocillo se mezclan 24 μ l de cultivo bacteriano con 6 μ l de una solución de antibiótico a la concentración adecuada (o 6 μ l de agua destilada en el control sin antibiótico). Esta mezcla se incuba durante 40 min a 37 °C.

3.2. Ensayo Micromax®

Para incluir la suspensión celular en el microgel (ver nota 4), primero se funde la agarosa de bajo punto de fusión del tubo Eppendorf suministrada por el kit Micromax®, colocándolo en un baño termostático a 90-100 °C. El tubo se debe colocar en un flotador de modo que la parte superior del tubo esté al nivel del agua. Se deja el tubo flotando en el agua a 90-100 °C, hasta que la agarosa se funde, es decir, en torno a 5 minutos. Como alternativa, se puede fundir la agarosa en un horno microondas.

Se transfiere el tubo Eppendorf con la agarosa, en el flotador, a otro baño termostático a 37 °C y se incuba durante 5 minutos hasta que la temperatura se haya estabilizado (ver nota 5).

Se añaden 30 µl del cultivo bacteriano al tubo Eppendorf con la agarosa y se mezclan cuidadosamente con una micropipeta, evitando formar burbujas de aire.

Se deposita una alícuota de la suspensión de células con agarosa, del tubo Eppendorf, sobre la cara recubierta de un portaobjetos suministrado en el kit, y se cubre con un cubreobjetos de cristal, evitando atrapar burbujas de aire. Se recomienda un volumen de muestra de 10 o 20 µl para un cubreobjetos de 18x18 mm o de 22x22 mm, respectivamente (ver nota 6).

Se coloca el portaobjetos horizontalmente en una superficie fría, como, una bandeja de metal o cristal previamente incubada a 4 °C.

Se deposita la bandeja con el portaobjetos en la nevera a 4 °C durante 5 minutos, para permitir que la agarosa solidifique.

Mientras el portaobjetos está en la nevera, se depositan 10 ml de la solución de lisis, proporcionada en el kit, en una bandeja con unas dimensiones un poco más grandes que un portaobjetos convencional (ver nota 7).

Se retira el cubreobjetos deslizándolo cuidadosamente, e inmediatamente se sumerge el portaobjetos en la solución de lisis en posición horizontal. Se incuba en ella durante 5 minutos a temperatura ambiente (22 °C) (ver nota 8).

Se levanta el portaobjetos con la ayuda de una lanceta y se sumerge horizontalmente en una bandeja con abundante agua destilada para eliminar los restos de la solución de lisis, durante 3 minutos. Utilizar guantes.

Para fijar las células, se sumerge el portaobjetos en posición horizontal en bandejas con concentraciones crecientes de etanol frío (70, 90 y 100%). Se incuba 2 min en cada concentración.

Se dejan secar los portaobjetos en posición horizontal a temperatura ambiente o en un horno a 37 °C.

Después de secar, se coloca el portaobjetos en un horno microondas a 750 W durante 4 min. Cuando el portaobjetos se enfría puede ser teñido inmediatamente o almacenarse en cajas archivadoras a temperatura ambiente en oscuridad durante varios meses.

Para teñir los portaobjetos, se les añaden 100 µl de solución de tinción (SYBR Gold en tampón TBE, 2,5 µl/ml). Se cubre el portaobjetos con un cubreobjetos de 24x60 mm y se incuba durante 2 min en oscuridad (ver notas 9 y 10).

Tras la incubación, se retira cuidadosamente el cubreobjetos y el portaobjetos se lava brevemente en tampón TBE. A continuación, se coloca un nuevo cubreobjetos de 24x60 mm (ver nota 11).

3.3. Análisis y clasificación de la muestra

Se examina la muestra utilizando un objetivo de aceite de inmersión de 100X. Dependiendo del nivel de daño, los nucleoides se pueden clasificar en tres categorías:

- Nucleoides sin daño: aquellos que difunden bucles de ADN intacto desde el centro residual bacteriano (ver figura 17 a, c, e, f).
- Nucleoides con bajo nivel de daño: aquellos que liberan halos de bucles de ADN intacto con algunos fragmentos de ADN alrededor (ver figura 17d).
- Nucleoides con alto nivel de daño: aquellos que presentan grandes halos de puntos de ADN fragmentado que difunden desde el centro residual (ver figura 17b).

Tras la incubación con la dosis de antibiótico correspondiente con el punto de corte de sensibilidad (ver nota 12), las cepas se categorizan como:

- Cepas sensibles (ver figura 17a-d): muestran nucleoides con el ADN fragmentado (ver figura 17b, d). Las cepas con CMI cerca del punto de corte de sensibilidad muestran los nucleoides con bajo nivel de daño (ver figura 17d). Cuanto más baja es la CMI de la cepa, más alto será el grado de daño de su nucleoide.

- Cepas no-sensibles (resistentes) (ver figura 17e, f): muestran los nucleoides intactos (ver figura 17f).

4. Notas

1. Observamos que, dependiendo de si el cultivo está en fase de crecimiento logarítmica o estacionaria, las bacterias responden de forma diferente al antibiótico. Cuando las bacterias están en fase logarítmica, la respuesta al antibiótico es más uniforme, y en general, más intensa que cuando están en fase estacionaria. Para eliminar la variabilidad y mejorar los resultados, siempre partimos de un cultivo en fase de crecimiento logarítmico.

2. La densidad celular en la matriz de agarosa no debe ser excesivamente elevada para evitar el solapamiento de células, pero tampoco deben estar demasiado dispersas, para facilitar una visualización rápida.

3. La concentración final añadida al pocillo debería corresponderse con el punto de corte de sensibilidad, es decir, la concentración de antibiótico utilizada para definir un aislado como sensible. El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y el Comité Europeo de Evaluación de la Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST) son las instituciones de referencia internacional que establecen los puntos de corte para los antibióticos y periódicamente publican guías con los datos actualizados.

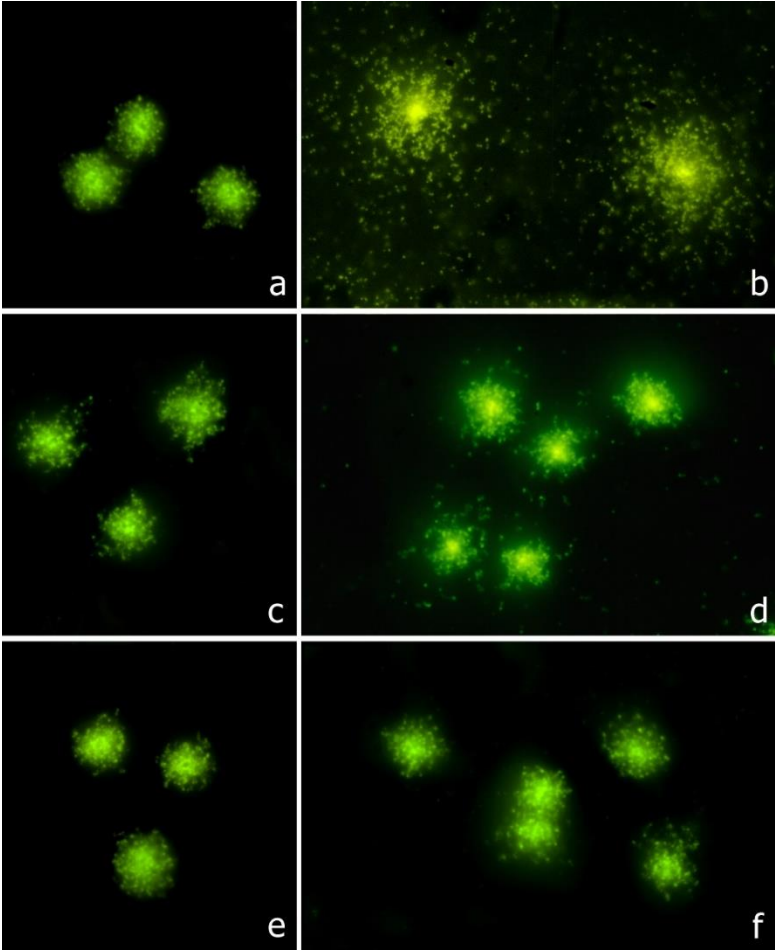


Figura 17. Tres cepas de *Escherichia coli* procesadas para determinar la susceptibilidad o resistencia a ciprofloxacino, a través de la visualización del nucleóide. La concentración del punto de corte de sensibilidad para ciprofloxacino en *E. coli*, según el criterio del CLSI (478), es 1 µg/ml. Las bacterias se expusieron a 0 µg/ml (primera columna, izquierda: **a**, **c**, **e**) y 1 µg/ml de ciprofloxacino (segunda columna, derecha: **b**, **d**, **f**). La primera cepa (primera línea: **a**, **b**) es sensible a la quinolona (CMI: 0,012 µg/ml). La segunda cepa (segunda línea: **c**, **d**) está en el límite de sensibilidad (CMI: 1 µg/ml). La tercera cepa (tercera línea: **e**, **f**) es resistente (CMI: 4 µg/ml). Tras la incubación con la dosis de quinolona, la cepa altamente sensible muestra una fragmentación masiva del ADN (**b**), la cepa menos sensible presenta un bajo nivel de fragmentación del ADN (**d**), y la cepa resistente libera sus nucleoides intactos (**f**).

4. El propósito de embeber a las células en un microgel, es proporcionarles un soporte inerte, y así poder ser procesadas en un ambiente similar a una suspensión, pero sobre un portaobjetos. De esta forma, se pueden manipular fácilmente para incubarlas en las soluciones, evitando centrifugaciones. Además, los posibles fragmentos de ADN que se eliminarían con el medio si las células se lisaran en suspensión, quedan retenidos en la matriz de agarosa.

5. Es importante mezclar las células en suspensión con la agarosa líquida cuando esta última se ha estabilizado a 37 °C, para evitar daño en las células debido al calor.

6. Recomendamos utilizar el mismo portaobjetos para ambos microgeles, cultivo control sin antibiótico y cultivo incubado con el antibiótico. De esta manera, ambas muestras serán procesadas de modo simultáneo, eliminándose la posible variabilidad resultante de la incubación en portaobjetos diferentes.

7. Se recomienda manipular la solución de lisis en una campana de gases, ya que es volátil y emite vapores tóxicos.

8. El paso de lisis elimina la pared celular bacteriana y las proteínas, por lo que los bucles de ADN que están empaquetados dentro de la célula difunden, dando lugar a halos que emergen de un núcleo central residual en aquellas bacterias sin ADN fragmentado. Si el ADN está fragmentado de forma masiva, el paso de lisis permite que los fragmentos de ADN difundan desde el centro residual formando un gran halo de puntos de ADN. Cuanto mayor sea el grado de fragmentación del ADN, mayor será el halo de puntos que se difunden desde el nucleóide bacteriano.

9. Tras su preparación, la solución de tinción puede almacenarse a 4 °C en oscuridad, durante periodos prolongados.

10. Dado el tamaño relativamente pequeño del genoma de los microorganismos, los fluorocromos clásicos como yoduro de propidio, DAPI, Hoechst 33258, etc... no son apropiados para la tinción. Para visualizar los fragmentos pequeños de ADN, es necesario usar un fluorocromo altamente sensible, como los de la familia SYBR. El SYBR Gold aporta una sensibilidad y fotoestabilidad excelentes en comparación con otros fluorocromos de la misma familia, permitiendo una evaluación visual precisa bajo microscopía de fluorescencia. No se utilizó solución de contratinción, ya que disminuye el contraste entre los pequeños puntos de ADN y el fondo.

11. El análisis de la muestra bajo microscopía de fluorescencia debe realizarse inmediatamente después de la tinción para evitar que se seque. Como alternativa, después de teñir, se puede mantener el portaobjetos durante unas horas a 4 °C, en una cámara húmeda, en oscuridad, para prevenir el secado. Si se seca, se puede retirar el cubreobjetos mediante incubación en tampón TBE, y volver a teñirse, tras un breve lavado.

12. A modo de control interno, es recomendable procesar una cepa control sensible y otra resistente. Tras la incubación con el antibiótico y el procesamiento técnico, los nucleoides de la cepa control sensible deberían mostrar su habitual fragmentación del ADN, mientras que los nucleoides de la cepa control resistente, deberían estar intactos, validando así la técnica y los resultados de las otras muestras.

Capítulo II

**Evaluación rápida de la resistencia
a carbapenémicos y ciprofloxacino
de cepas clínicas de *Acinetobacter
baumanni***

Resumen:

Las infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* multirresistente constituyen una grave amenaza para la vida a nivel mundial, y una terapia antibiótica temprana adecuada es decisiva para el éxito terapéutico. Por estos motivos, la detección rápida de la susceptibilidad antibiótica en este patógeno es un desafío clínico. Se evaluaron, por separado, dos variantes del kit Micromax® para la detección rápida *in situ* de sensibilidad o resistencia a meropenem y ciprofloxacino, en 322 aislados clínicos. La liberación del nucleoide es el criterio de sensibilidad a los betalactámicos (carbapenémicos), mientras que la difusión de fragmentos de ADN que emergen del nucleoide describe la actividad de la quinolona. Todas las cepas sensibles y resistentes se categorizaron correctamente según los resultados de las CMIs y los criterios del CLSI, en 100 min. Por lo tanto, nuestra tecnología es una herramienta prometedora para la identificación rápida de la resistencia a carbapenémicos y quinolonas en cepas de *A. baumannii* en entornos hospitalarios.

1. Introducción

Uno de los desafíos más importantes de la medicina práctica a nivel mundial, es el incremento progresivo de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a múltiples fármacos. Este patógeno oportunista muestra una capacidad alarmante de propagación y persistencia nosocomial, causando una amplia variedad de infecciones graves, principalmente en pacientes hospitalizados inmunodeprimidos, y se asocia con una elevada tasa de mortalidad. La enfermedad más común causada por *A. baumannii* es la neumonía severa asociada

habitualmente a ventilación mecánica, pero este patógeno también causa infecciones en el torrente sanguíneo, el sistema nervioso central, el tracto urinario, la piel, los tejidos blandos y los huesos (2, 25).

El tratamiento de primera línea para la infección grave por *A. baumannii* consiste en un antibiótico carbapenémico como imipenem o meropenem. Estos son betalactámicos que afectan a la síntesis del peptidoglicano al interactuar con el centro activo de las proteínas de unión a penicilina (PBPs), resultando en la inhibición de la reacción de transpeptidación (191). De modo alarmante, la resistencia a los carbapenémicos es cada vez más común. Esto se debe principalmente a la producción de carbapenemasas codificadas por cromosomas o plásmidos, pero también, a cambios en las porinas de la membrana externa, bombas de expulsión o alteraciones en la afinidad o la expresión de PBPs (18). Estos mecanismos a menudo funcionan de forma conjunta, dando lugar a cepas resistentes a múltiples fármacos (2). Otras opciones de tratamiento incluyen el uso de quinolonas como ciprofloxacino o levofloxacino, que inducen roturas de doble cadena de ADN reteniendo la ADN girasa y/o la topoisomerasa IV en el ADN, dando lugar a la fragmentación del ADN (177). Sin embargo, la resistencia a las quinolonas está también emergiendo, a través de mutaciones principalmente en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) dentro de los genes *gyrA* y *parC* (479–481), que interfieren con la unión a la diana, pero también hay resistencias debidas a las bombas de expulsión (18).

Los antibiogramas estándar requieren de alrededor de 24 horas o incluso más, para generar resultados tras la identificación del aislado bacteriano. Eventualmente, mientras se espera por los resultados del

laboratorio de microbiología, los médicos deben implementar una terapia antibiótica empírica. Sin embargo, la terapia antimicrobiana empírica inapropiada se asocia con un aumento de la mortalidad. Una terapia antibiótica adecuada de modo temprano, es esencial para mejorar los resultados (470–472). Además, el uso inadecuado de antibióticos contribuye a la aparición y propagación de resistencia a los medicamentos e incrementa los efectos tóxicos y los costes de la atención médica. Evaluar la resistencia a los antimicrobianos de forma rápida y fiable, debería de ser de gran relevancia para la selección de la terapia antibiótica más apropiada y optimizar así el uso de los antimicrobianos. Por ejemplo, una evaluación rápida de la acción de los carbapenémicos puede garantizar un tratamiento más adecuado en caso de sensibilidad microbiana, evitando el uso indebido de antibióticos que deberían ser reservados para casos de resistencia probada. Sin embargo, dada la gran facilidad de *A. baumannii* para desarrollar resistencia a múltiples fármacos, una evaluación rápida de la sensibilidad a carbapenémicos y quinolonas debería ser de gran interés. De hecho, un estudio multicéntrico español reciente reveló que más del 93% y 81% de los aislados de *A. baumannii* presentan ausencia de sensibilidad a ciprofloxacino e imipenem, respectivamente.

Hemos desarrollado un procedimiento para evaluar la integridad del ADN en bacterias, que ha sido validado como un ensayo rápido y simple para la determinación de sensibilidad o resistencia a quinolonas en *Escherichia coli* (465–467). Las células atrapadas en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos se incuban con una solución de lisis para eliminar la pared celular de todas las bacterias de la población; luego se visualizan los nucleoides bajo microscopía de

fluorescencia tras teñir con el fluorocromo SYBR Gold. Usando nuestro procedimiento, la fragmentación del ADN inducida por quinolonas se visualiza como puntos de ADN que difunden periféricamente desde el nucleoide. Cuanto mayor sea la fragmentación del ADN, mayor será el número de fragmentos de ADN y el diámetro del área de difusión alrededor del núcleo residual central. En caso de resistencia a quinolonas, los nucleoides aparecen intactos, con las fibras de ADN formando bucles con una extensión limitada (467).

Posteriormente, el procedimiento se modificó para valorar la integridad de la pared celular, es decir, para evaluar la eficacia de los antibióticos que actúan sobre la síntesis del peptidoglicano (468). Para ello, la lisis debe adaptarse para afectar sólo a aquellas bacterias cuyas paredes celulares hayan sido dañadas por el antibiótico. Si la bacteria es sensible, la pared celular debilitada es retirada por la solución de lisis de tal modo que el nucleoide contenido dentro de la bacteria se relaja y se difunde. En el caso de una cepa resistente, las bacterias prácticamente no se ven afectadas por la solución de lisis, por lo que no liberan el nucleoide, y mantienen su forma habitual.

En este trabajo, ponemos de manifiesto la utilidad de ambas variantes técnicas para determinar rápidamente la susceptibilidad o resistencia de *A. baumannii* a ciprofloxacino y a los carbapenémicos, utilizando meropenem como antibiótico modelo de este grupo.

2. Material y métodos

2.1. Cepas bacterianas

Se analizaron trescientas veintidós cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Universitario de A Coruña (recogidas desde 2001 a 2011) y de la colección bacteriana de la Red Española para la Investigación en Enfermedades Infecciosas. En algunos casos, se realizó una PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP)-PCR para descartar clonalidad (482). Además, se evaluaron dos cepas de referencia obtenidas de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC, Manassas, VA), ATCC 17978 y ATCC 19606, que muestran sensibilidad a meropenem y ciprofloxacino. También se utilizaron como controles, cepas específicas de *A. baumannii* con mecanismos de resistencia a carbapenem y ciprofloxacino definidos. Las CMIs se determinaron por microdilución automatizada (MicroScan Walkaway; Siemens) y se confirmaron por Etest (AB Biodisk; bioMérieux) según las instrucciones del fabricante y siguiendo los criterios de CLSI para la categorización de la susceptibilidad a los antibióticos.

2.2. Ensayo de la fragmentación del ADN

Las determinaciones de la fragmentación del ADN y de la integridad de la pared celular se llevaron a cabo como un procedimiento a ciegas, sin conocimiento de las CMIs. Se emplearon dos variantes del kit Micromax® para microscopía de fluorescencia (Halotech DNA SL, Madrid, España), Micromax-Q y Micromax WG-, para evaluar la integridad del nucleóide y de la pared celular,

respectivamente. La única diferencia entre los dos ensayos reside en la solución de lisis.

Las bacterias se cultivan de forma rutinaria en agar Mueller-Hinton a 37 °C durante 24 h. Se transfiere una colonia a medio líquido Mueller-Hinton y se cultiva a 37 °C durante 90 minutos en agitación con aireación. A continuación, el cultivo se diluye a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,1 en medio Mueller-Hinton. Tras este paso se incuban a 37 °C en tubos de 200 μ l, con meropenem a 0, 4, 8 y 16 μ g/ml y con ciprofloxacino a 0, 1, 2 y 4 μ g/ml durante 60 minutos, en un volumen final de 30 μ l. Estas dosis se seleccionaron coincidiendo con las concentraciones del punto de corte de susceptibilidad, resistencia intermedia y resistencia, del CLSI (483). El kit incluye tubos de microcentrífuga con tapón a presión de 0,5 ml que contienen alícuotas gelificadas de agarosa de bajo punto de fusión. El tubo se coloca en un baño termostático a entre 90 y 100 °C durante aproximadamente 5 minutos para fundir completamente la agarosa y luego se traslada a otro baño de agua a 37 °C. Se añaden treinta microlitros de la muestra diluida y se mezclan con la agarosa fundida (la concentración final alcanzada es de 5 a 10 millones de microorganismos/ml). Se dispensa, con ayuda de una pipeta, una alícuota de 10 μ l de la mezcla de muestra y agarosa sobre un portaobjetos pretratado y se cubre con un cubreobjetos de 18x18 mm. El portaobjetos se coloca sobre una bandeja fría en el frigorífico (4 °C) durante 5 min para permitir que la agarosa forme un microgel con las células intactas atrapadas en su interior. Se retiran cuidadosamente los cubreobjetos y el portaobjetos se sumerge inmediatamente en posición horizontal en 10 ml de la solución de lisis específica durante 5 min, a

temperatura ambiente para las bacterias incubadas con meropenem y a 37 °C para las incubadas con ciprofloxacino. El portaobjetos se lava en posición horizontal en una bandeja con abundante agua destilada durante 3 min, se deshidrata incubando horizontalmente con concentraciones crecientes (70%, 90% y 100%) de etanol frío (-20 °C) durante 3 min cada uno, y se secan al aire o en una estufa. El ADN se tiñe con 25 µl del fluorocromo SYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) diluido 1:200 en tampón TBE (0,09 M Trisborato; 0,002 M EDTA; pH 7,5) durante 2 min en oscuridad, con un cubreobjetos. Tras un breve lavado en tampón fosfato (pH 6,88) (Merck, Darmstadt, Alemania), se coloca un cubreobjetos de 24x60 mm y los portaobjetos se visualizan bajo microscopía de fluorescencia.

3. Resultados y discusión

Según el procedimiento, una cepa se considera sensible a meropenem cuando los nucleoides se liberan tras la incubación con el fármaco a una concentración igual o superior al punto de corte de susceptibilidad del CLSI (4 µg/ml), es decir, tras incubar a 4, 8 y 16 µg/ml. Las cepas intermedias comienzan a liberar sus nucleoides desde la dosis coincidente con el punto de corte de resistencia intermedia del CLSI (8 µg/ml), esto es, con 8 y 16 µg/ml. Las cepas resistentes nunca liberan sus nucleoides, o lo hacen solo después de la incubación con el fármaco a la concentración del punto de corte de resistencia del CLSI (16 µg/ml). Respecto al ciprofloxacino, una cepa se clasifica como sensible cuando se observa fragmentación del ADN ocasionada por la incubación con el fármaco a una concentración igual o superior a la dosis del punto de corte de susceptibilidad del CLSI

(1 µg/ml), es decir, a 1, 2 y 4 µg/ml. Una cepa intermedia mostrará el ADN fragmentado después de la incubación con la dosis del punto de corte de resistencia intermedia del CLSI (2 µg/ml), esto es, a 2 y 4 µg/ml. En el caso de una cepa resistente, los nucleoides siempre aparecen intactos o exhiben fragmentación tan solo después del tratamiento con el fármaco a la concentración del punto de corte de resistencia del CLSI (4 µg/ml).

Inicialmente se probaron como control, cepas sensibles y cepas con mecanismos conocidos de reducción de la sensibilidad o resistentes. Para los estudios con meropenem, se seleccionaron como cepas sensibles las cepas comerciales ATCC 19606 (CMI 0,25 µg/ml) y ATCC 17978 (CMI 0,5 µg/ml). Como resistentes se escogieron las cepas productoras de oxacilinasas OXA-24 (cepa RYC 52763/97; CMI 256 µg/ml) (484), OXA-58 (CMI 16 µg/ml) y OXA-23 (CMI 16 µg/ml). Se seleccionó también una cepa intermedia con CMI de 8 µg/ml, JC10/01 (pAT-RA-34s) (485). Las imágenes correspondientes se muestran en la figura 18. Las cepas sensibles liberaron su nucleoide tras incubar con 4, 8 y 16 µg/ml, mientras que las intermedias lo hicieron después de 8 y 16 µg/ml, y las cepas resistentes no los dispersaron en ninguna dosis, exceptuando algunas cepas con CMI 16 µg/ml, en las que se liberaron algunos nucleoides.

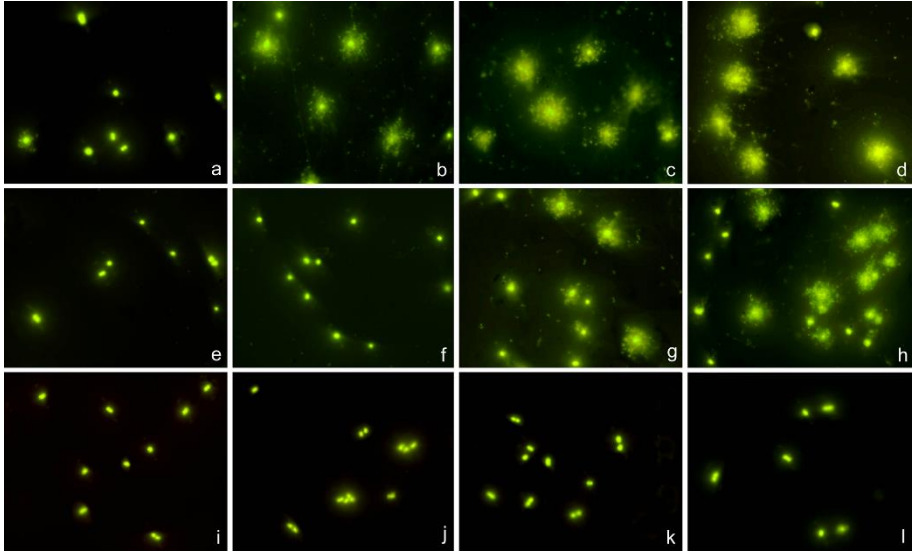


Figura 18. Tres cepas representativas de *A. baumannii*, incubadas con meropenem durante 60 min a: 0 µg/ml (**a, e, i**); 4 µg/ml, concentración coincidente con el punto de corte de sensibilidad del CLSI (**b, f, j**); 8 µg/ml, concentración del punto de corte de resistencia intermedia del CLSI (**c, g, k**); y 16 µg/ml, concentración correspondiente al punto de corte de resistencia del CLSI (**d, h, l**). Las bacterias se procesaron para determinar los efectos sobre la pared celular, evaluados a través de la liberación del nucleóide después de la incubación con una solución de lisis específica. (**a-d**) Cepa sensible ATCC 19606 (CMI: 0,25 µg/ml); (**e-h**) cepa intermedia JC10/01 (pAT-RA-34s) (CMI: 8 µg/ml); (**i-l**) cepa resistente RYC 52763/97 productora de OXA-24 (CMI: 256 µg/ml). La diseminación de los nucleóides fue obvia en la cepa sensible después de 4, 8 y 16 µg/ml, pero en la cepa intermedia solo tras 8 y 16 µg/ml. Se visualizó un fondo discreto de fragmentos de ADN extracelular en los cultivos afectados por el meropenem. En la cepa intermedia, a pesar de la sensibilidad tras 8 y 16 µg/ml, una porción de células permanecen aparentemente inalteradas, sin liberación del nucleóide. Las células de la cepa resistente siempre mantuvieron su apariencia morfológica habitual.

Respecto al ciprofloxacino, se utilizó la cepa ATCC 17978 como control sensible (CMI 0,125 µg/ml). También se emplearon como controles, una cepa intermedia aislada de clínica (CMI 2 µg/ml) y una

cepa resistente con mutaciones resultantes en cambios en el codón 83 para *gyrA* (TCA → TTA) y en el codón 80 para *parC* (TCG → TTG) (CMI 64 µg/ml) (el subrayado indica el cambio de base). La cepa sensible mostró sus nucleoides con el ADN fragmentado después de la incubación con 1, 2 y 4 µg/ml, mientras que la cepa intermedia lo hizo sólo tras la incubación a 2 y 4 µg/ml, y en la cepa resistente, los nucleoides siempre aparecieron intactos (figura 19).

Una vez que el procedimiento fue probado con éxito en las cepas control, se procesaron 322 aislados clínicos con los kits Micromax. Las CMIs determinadas por microdilución automatizada y confirmadas por Etest, interpretadas según los criterios de CLSI, se consideran como método de referencia. De acuerdo con las CMIs y los criterios del CLSI, 39 de los aislados fueron sensibles tanto a meropenem como a ciprofloxacino, 37 sensibles a meropenem y resistentes a ciprofloxacino, solo uno fue resistente a meropenem y sensible a ciprofloxacino, y 159 fueron resistentes tanto a meropenem como a ciprofloxacino. En cuanto a las cepas intermedias, 85 fueron intermedias a meropenem y resistentes a ciprofloxacino, y sólo una fue intermedia a ciprofloxacino y sensible a meropenem. Por lo tanto, en resumen: 77, 85 y 160 cepas fueron sensibles, intermedias, y resistentes a meropenem, respectivamente; mientras que, 40, 1, y 281 fueron susceptibles, intermedias y resistentes a ciprofloxacino, respectivamente. El mecanismo causante de la falta de sensibilidad a meropenem identificado en 140 cepas intermedias y resistentes de las seleccionadas fue la actividad hidrolizante de carbapenémicos, concordando con estudios a nivel nacional que demostraron que las enzimas tipo OXA (OXA-24 específicamente (484, 486)) son las más

prevalentes en España. La causa de la ausencia de sensibilidad a ciprofloxacino en 110 aislados, se atribuyó a las mutaciones simultáneas que dan lugar a cambios en el codón 83 para *gyrA* y en el codón 80 para *parC* (479, 480, 487).

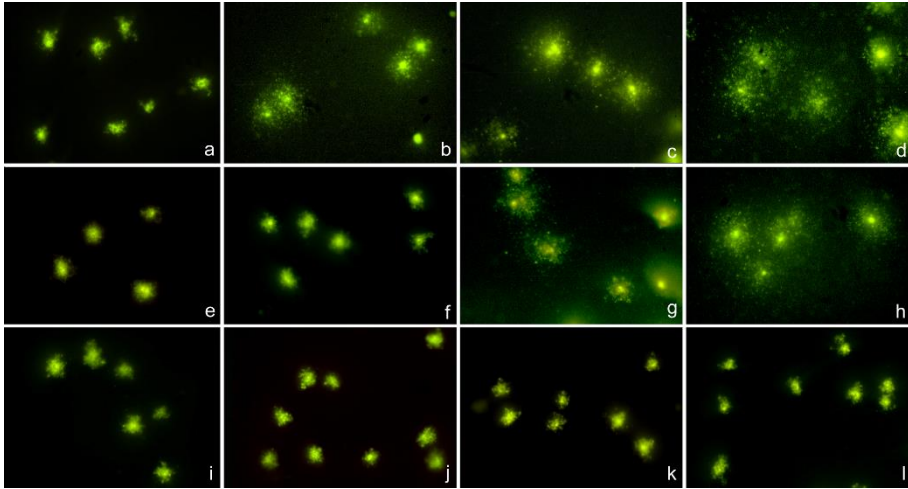


Figura 19. Tres cepas representativas de *A. baumannii*, incubadas con ciprofloxacino durante 40 min a: 0 µg/ml (**a, e, i**); 1 µg/ml, correspondiente con el punto de corte de sensibilidad del CLSI (**b, f, j**); 2 µg/ml concentración del punto de corte de resistencia intermedia del CLSI (**c, g, k**) y 4 µg/ml concentración del punto de corte resistencia del CLSI (**d, h, l**). Las bacterias fueron procesadas para visualizar los nucleoides, determinando la presencia o ausencia de fragmentación del ADN cromosómico, es decir, dispersión de puntos de ADN. (**a-d**) Cepa sensible ATCC 17978 (CMI $\leq 0,125$ µg/ml); (**e-h**) cepa intermedia (CMI, 2 µg/ml); (**i-l**) cepa resistente que posee una mutación en el codón *gyrA* Ser83 (TCA → TTA) y otra en el codón *parC* Ser80 (TCG→TIG) (CMI, 64 µg/ml) (el subrayado indica un cambio de base). La fragmentación del ADN fue evidente en la cepa sensible después de la incubación con el fármaco a 1, 2 y 4 µg/ml, pero en la cepa intermedia solo lo fue tras la incubación con 2 y 4 µg/ml. Los nucleoides de la cepa resistente nunca mostraron fragmentación.

La susceptibilidad a meropenem y/o ciprofloxacino se identificó siempre correctamente mediante el ensayo. Lo mismo ocurrió en el

caso de resistencia a los antibióticos. El ensayo asignó correctamente la única cepa categorizada como intermedia a ciprofloxacino. La condición de resistencia intermedia a meropenem atribuida a 85 de los aislados según los criterios del CLSI, se detectó de modo similar empleando el ensayo en 82 casos; el resto (3,5%) se visualizaron como resistentes, previniéndose así la clasificación como sensibles y la presunta administración de carbapenémicos, que podría provocar un fracaso terapéutico. Debemos enfatizar que las cepas intermedias a meropenem nunca se detectaron como sensibles. Cincuenta cepas del mismo estudio también fueron examinadas para determinar la susceptibilidad o resistencia a imipenem y levofloxacino. Los resultados coincidieron plenamente con los obtenidos para meropenem o ciprofloxacino, siguiendo los criterios del CLSI y la técnica diseñada.

Desde un punto de vista práctico, el clínico necesita información rápida y sencilla sobre la sensibilidad o no-sensibilidad del aislado, con el fin de administrar o no, el antibiótico apropiado o para valorar adecuadamente el tratamiento antibiótico después de la administración de la terapia empírica inicial. Pese al interés para el microbiólogo, la discriminación entre las clases intermedia o resistente no debería modificar la decisión terapéutica, que inicialmente debería tender a descartar el uso de meropenem. Clasificar los aislados como sensibles o no sensibles empleando el punto de corte de susceptibilidad del CLSI supone una precisión del 100% del ensayo. De este modo, el manejo técnico del ensayo podría simplificarse todavía más, al incubar el aislado solo con la concentración del fármaco coincidente con el punto de corte de sensibilidad del CLSI

procesándose simultáneamente como controles del ensayo, cepas validadas como susceptibles, intermedias y resistentes.

El procesado técnico de las bacterias previamente incubadas con el antibiótico tiene una duración de 40 min, y la visualización bajo el microscopio de fluorescencia es rápida y concluyente. La incubación previa con los antibióticos se estandarizó en 60 min. Aunque para las quinolonas 40 min son suficientes; en el caso de los betalactámicos, son más adecuados 60 min. Este tiempo de incubación se estimó para bacterias en fase de crecimiento exponencial en medio de cultivo líquido. Cuando las bacterias provienen de una placa de agar, realizar una incubación de 90 min en Mueller-Hinton líquido previa a la adición de carbapenémicos genera imágenes de las bacterias más homogéneas. Esto se debe al crecimiento exponencial de toda la población en el momento en el que se añade el antibiótico.

En los cultivos de *A. baumannii* sensibles a meropenem, se observan durante el ensayo algunos fragmentos de ADN extracelular como fondo, sin la necesidad de un paso de lisis (figura 18) (468). Sin embargo, este fondo es variable, suele ser muy escaso y a veces puede estar presente en cultivos no sometidos a incubación con el antibiótico. Las cepas intermedias pueden mostrar o no estos fragmentos de ADN extracelular. Es mucho más riguroso utilizar la solución de lisis para valorar el posible efecto de meropenem, evaluando la integridad de la pared celular a través de la liberación del nucleoide. La presencia de fragmentos de ADN extracelular es un suplemento, pero no un criterio riguroso.

Se ha demostrado que el ensayo que se describe aquí es un procedimiento rápido, simple y fiable para determinar la sensibilidad o no-sensibilidad a carbapenémicos y quinolonas en cepas clínicas de *A. baumannii*. Esta técnica puede tener una gran relevancia clínica, dado el peligro que representa este patógeno para la seguridad del paciente y la importancia crucial de una terapia antibiótica temprana adecuada para mejorar los resultados en pacientes vulnerables hospitalizados (470–472). Un tratamiento temprano adecuado también reduce la duración de la estancia hospitalaria y los costes sanitarios. En el contexto actual en el que el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos se han visto disminuidos, las estrategias terapéuticas racionales deben dirigirse a restringir el uso de aquellos que son más eficaces, para evitar la aparición y propagación de resistencias (24). Esto también podría ser un beneficio potencial del ensayo. Es previsible que el procedimiento para la evaluación rápida de sensibilidad o resistencia se implemente para más familias de antibióticos, no sólo en *A. baumannii* sino también en otros patógenos de alto impacto clínico.

Capítulo III

**Determinación rápida de
resistencia a colistina en cepas
clínicas de *Acinetobacter
baumanni* a través del uso del test
Micromax.**

Resumen:

La colistina es un antibiótico antiguo que ha sido utilizado como opción terapéutica para bacterias Gram-negativas resistentes a carbapenémicos y multirresistentes, como *Acinetobacter baumannii*. Este patógeno produce infecciones potencialmente peligrosas para la vida, fundamentalmente en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos. La detección rápida de resistencia a colistina puede mejorar los resultados del paciente y prevenir la diseminación de cepas resistentes. Con este propósito se evaluó la tecnología Micromax en cuatro cepas isogénicas de *A. baumannii* con mecanismos de resistencia a colistina conocidos, y en sesenta y seis aislados clínicos (50 sensibles y 16 resistentes). Se evaluaron dos parámetros, la fragmentación del ADN y el daño en la pared celular. Para determinar la fragmentación del ADN, las células atrapadas en un microgel, se incubaron en una solución de lisis para eliminar la pared celular, y los nucleoides liberados se visualizaron bajo microscopía de fluorescencia. El ADN fragmentado se observó como puntos difundiéndose desde el nucleoide. Para evaluar la integridad de la pared celular, las células se incubaron con una solución de lisis que retira solamente las paredes celulares que se encuentran debilitadas, dando lugar a la liberación del nucleoide únicamente en las células afectadas. Se demostró una relación dosis-respuesta entre la concentración de colistina y, el porcentaje de bacterias con el ADN fragmentado y con la pared celular dañada. Estos efectos del antibiótico se producen de manera tardía y menos frecuente en cepas resistentes. Las curvas características operativas del receptor (ROC) demostraron que tanto la fragmentación del ADN como el daño en la pared celular son parámetros excelentes para identificar cepas

resistentes. Cuando se obtiene un porcentaje igual o inferior al 11% de bacterias con la pared celular dañada tras la incubación con 0,5 µg/ml de colistina, se identifican cepas resistentes de *A. baumannii* con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96%. Los resultados se obtuvieron en 3 h 30 min. Este es un test fiable, rápido y simple para detectar resistencia a colistina en *A. baumannii*, con gran valor potencial en situaciones clínicas críticas.

1. Introducción

Acinetobacter baumannii es un cocobacilo Gram-negativo que sobrevive en el ambiente hospitalario y tiene la habilidad de resistir durante largos periodos de tiempo en superficies deshidratadas (10, 24). Este microorganismo predomina en las unidades de cuidados intensivos (UCIs) y puede producir neumonía grave asociada a ventilación mecánica, infecciones del torrente sanguíneo asociadas a catéter venoso central e infecciones del tracto urinario asociadas a sonda, además de infecciones en el sistema nervioso central, piel, tejidos blandos y huesos (2, 24, 25).

La tasa mundial de cepas de *A. baumannii* multirresistentes está aumentando de forma alarmante, e incluso está apareciendo panresistencia (40). Por ejemplo; el 36,8% de las cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes con neumonía asociada a respirador en Estados Unidos son resistentes a carbapenémicos; y en Grecia, las tasas de resistencia en los aislados de las unidades de cuidados intensivos llegan al 85%. Las resistencias se podrían extender también a fluoroquinolonas, cefalosporinas, etc (473).

La colistina (polimixina E), un antiguo antibiótico de la familia de las polimixinas descubierto en 1949, ha experimentado un resurgimiento en los últimos años como opción terapéutica contra bacterias Gram-negativas multirresistentes o resistentes a carbapenémicos (244, 248, 472, 488–490). Las polimixinas están formadas por un anillo peptídico policatiónico hidrófilo y una cadena lateral tripeptídica con una cola lipofílica con un ácido graso (491). Son antibióticos bactericidas que se unen a lipopolisacáridos y fosfolípidos en la cara externa de la membrana celular de bacterias Gram-negativas. El anillo peptídico policatiónico tiene una fuerte afinidad por los cationes divalentes y desplaza de forma competitiva el calcio y el magnesio de los grupos fosfato de carga negativa del lípido A de los LPSs (492, 493). Altera la estabilidad de la molécula de LPS, provocando la ruptura de la membrana celular externa, alterando así la permeabilidad celular. Las moléculas de polimixina se insertan en la membrana externa a través del dominio hidrofóbico de la cadena de ácido graso, produciendo un efecto similar al detergente que provoca fisuras transitorias (493). Esto provoca la liberación del contenido intracelular y posiblemente una mayor captación de la polimixina, es decir, estamos ante una vía de captación autopromovida, que provoca la muerte bacteriana (491).

La resistencia a colistina es relativamente rara, probablemente debido a su uso poco frecuente en estos últimos 50 años y quizás también, por sus propiedades como detergente. La mayoría de los mecanismos de resistencia a polimixinas se basan en modificaciones del lípido A de los LPS, lo que disminuye su carga negativa neta, impidiendo o reduciendo su unión inicial. Estos cambios pueden estar

asociados a mutaciones en el sistema bicomponente PmrA/B, que aumentan el nivel de expresión de la fosfoetanolamina transferasa modificadora del lípido A, PmrC, dando lugar a la adición de fosfoetanolamina al lípido A (494–497). La resistencia también puede ser consecuencia de la sustitución del lípido A por aminoarabinosa, que requiere los productos de los loci *ugd* y *pbg* (498, 499). Por desgracia, en los últimos años se han producido varios brotes de infecciones causadas por *A. baumannii* resistente a colistina, surgidos en Asia (500, 501). Es muy probable que la aparición de *A. baumannii* resistente a colistina tenga importantes repercusiones en la salud pública, ya que no se espera que en los próximos años se disponga de nuevos antibióticos con actividad contra bacterias Gram-negativas (502). En consecuencia, urge optimizar el uso clínico de la colistina y reducir el desarrollo y la propagación de cepas resistentes.

Dado el elevado riesgo de mortalidad en pacientes con infecciones adquiridas en la unidad de cuidados intensivos, se ha demostrado que una terapia antibiótica adecuada y temprana mejora significativamente los resultados y reduce los costes sanitarios (470–472). Los antibiogramas estándar requieren de alrededor de 24 horas o más tras el aislamiento e identificación de la bacteria, para proporcionar resultados. Pero en situaciones clínicas críticas, la disponibilidad rápida de información respecto a la resistencia a colistina y carbapenémicos puede ser esencial.

En un estudio anterior, se validó un procedimiento sencillo para evaluar rápidamente la resistencia a ciprofloxacino y carbapenémicos en *A. baumannii* mediante la tecnología Micromax® (477). En el caso de los carbapenémicos, las células inmersas en un microgel sobre un

portaobjetos, se incubaron con una solución de lisis que retira únicamente la pared celular en aquellas bacterias en las que la síntesis del peptidoglicano se ha visto afectada por el betalactámico. De este modo, solo las bacterias sensibles liberan el nucleoide, que se visualiza al microscopio mediante tinción fluorescente. Las bacterias sin afectación por el antibiótico mantienen su morfología habitual (468, 477). Para la evaluación del ciprofloxacino, el proceso de lisis retira la pared celular de todas las bacterias. Las que sufren afectación por la quinolona, es decir, las que presentan roturas de doble cadena en el ADN como consecuencia del atrapamiento por la ADN girasa y la topoisomerasa IV, muestran difusión de fragmentos de ADN que emergen del núcleo central residual, mientras que las cepas resistentes revelan sólo nucleoides intactos (465–467).

Además de las quinolonas y los carbapenémicos, la determinación rápida de resistencia a colistina en *A. baumannii* es de gran interés. No solo tiene un valor clínico decisivo para los pacientes, sino que también podría contribuir a optimizar el uso médico de la colistina y de este modo ayudar a prevenir la diseminación de cepas resistentes a un antibiótico de último recurso. En este estudio describiremos la eficacia de utilizar ensayos de daño del ADN y de la pared celular para determinar rápidamente la resistencia de *A. baumannii* a colistina.

2. Material y métodos

2.1. Cepas bacterianas

Los procedimientos para determinar la fragmentación del ADN cromosómico y el daño de la pared celular *in situ* se analizaron primero

con cepas control de *A. baumannii* con mecanismos de resistencia conocidos a la colistina. Estas cepas isogénicas de laboratorio derivaron de cepas sensibles de la Colección Americana de Cepas Tipo (ATCC; Manassas, VA), ATCC 19606 ColS (CMI: 0,25 µg/ml), ATCC 19606 ColR (CMI: 16 µg/ml), ATCC 19606 ColR *lpxA* (CMI: 32 a 64 µg/ml), and ATCC 19606 ColR *lpxD* (CMI > 64 µg/ml) (496,503,504).

Posteriormente, se analizaron 66 aislados de *A. baumannii* obtenidos en el Hospital Universitario de A Coruña y en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla entre 2001 y 2012. En algunos casos se llevó a cabo una PCR palindrómica extragénica repetitiva (REP-PCR) para descartar clonalidad (495). Todos los aislados fueron obtenidos de muestras clínicas excepto un grupo de 4 y otro grupo de 5 cepas isogénicas derivadas de laboratorio. Las CMIs se determinaron por microdilución automatizada (MicroScan WalkAway; Siemens), con un mínimo de seis réplicas. Según la concentración del punto de corte de sensibilidad del CLSI (2 µg/ml), se clasificaron 50 cepas como sensibles a colistina (CMI ≤ 2 µg/ml) y 16 como resistentes (CMI ≥ 4 µg/ml) (5 con una CMI de 4 µg/ml, otras 5 con una CMI de 8 µg/ml, 2 con CMI de 16 µg/ml, 2 con CMI de 32 µg/ml y 2 con CMI > 32 µg/ml). De estas cepas resistentes, 10 son derivadas de laboratorio y 6 son aislados clínicos naturales.

2.2. Evaluación del daño en el ADN y en la pared celular

Las determinaciones de la fragmentación del ADN y de la integridad de la pared celular se llevaron a cabo como procesos ciegos,

sin conocimiento de las CMI's y fueron realizadas paralelamente por tres personas de modo independiente. Se emplearon dos variantes del kit Micromax® para microscopía de fluorescencia (uso exclusivo para investigación) (Halotech DNA SL, Madrid, España), Micromax Q para evaluar la integridad del nucleóide y Micromax WG, para evaluar la pared celular. La única diferencia entre ambos reside en la composición de la solución de lisis (477).

Las bacterias se cultivaron de manera rutinaria en placas de agar Mueller-Hinton a 37 °C durante 24 h. Para cada cepa se seleccionó una colonia y se incubó en 2 ml de medio líquido Mueller-Hinton a 37 °C durante 90 minutos en agitación. Las bacterias se diluyeron a una DO₆₀₀ de 0,1 en Mueller-Hinton y se incubaron con colistina durante 60 min a 37 °C en un volumen final de 30 µl en tubos de 200 µl. En los experimentos iniciales, las cuatro cepas control ATCC 19606 se incubaron con once dosis de colistina en un rango que comprende desde 0 a 64 µg/ml. Posteriormente, las otras 66 cepas se trataron con las siguientes dosis de colistina: 0; 0,4; 0,5; 0,75 y 1 µg/ml.

Se diluyó una alícuota de cada muestra a una concentración de entre 5 y 10 millones de microorganismos por mililitro en medio Mueller-Hinton. El kit incluye tubos con tapa de 0,5 ml que contienen alícuotas de agarosa de bajo punto de fusión gelificada. El tubo se coloca en un baño termostático a una temperatura entre 90 y 100 °C durante 5 minutos para fundir la agarosa totalmente y luego se deposita en otro baño a 37 °C. Una vez atemperada se añaden 30 µl de muestra diluida al tubo y se mezcla bien con la agarosa para obtener una preparación homogénea. Se pipetea a un portaobjetos pretratado, una alícuota de 10 µl de la mezcla agarosa-muestra y se cubre con un

cubreobjetos de 18x18 mm. Los portaobjetos se depositan sobre una bandeja fría que se coloca en la nevera (4 °C) durante 5 minutos para permitir que la agarosa forme un microgel con las células intactas atrapadas en su interior. A continuación, el cubreobjetos se retira cuidadosamente, y el portaobjetos se sumerge inmediatamente y en posición horizontal en 10 ml de solución de lisis específica durante 5 minutos a temperatura ambiente. El portaobjetos se lava manteniendo la horizontalidad en una bandeja con abundante agua destilada durante 3 min, y se deshidrata por incubación también horizontal en etanol frío (-20 °C) con concentraciones crecientes (70% - 90% - 100%) durante 2 minutos cada uno, y se deja secar en el interior de una estufa con ventilación. Los portaobjetos secos se incuban en un horno microondas a 750 W durante 4 min, y luego se realiza una tinción del ADN con 100 µl del fluorocromo SYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) diluido 1:200 en TBE (0,09 M tris-borato; 0,002 M EDTA; pH 7,5) durante 2 minutos en oscuridad, cubriendo previamente el portaobjetos con un cubreobjetos de cristal. A continuación, se realiza un breve lavado en tampón fosfato (pH 6,88) (Merck, Darmstadt, Germany) y se coloca un cubreobjetos de 24x60 mm. Los portaobjetos se visualizan bajo microscopía de fluorescencia y se evalúan entre 200 y 500 bacterias en cada punto experimental. El criterio de clasificación de fragmentación del ADN es la presencia de fragmentos de ADN que difunden del nucleoide (467, 477). Por otro lado, el daño de la pared celular se detecta como la liberación del nucleoide (468, 477). El tiempo necesario para el ensayo incluye 1 h y 30 min de incubación en medio de cultivo Mueller-Hinton, 1 h de incubación con colistina, 40 min de procesado

técnico (10 min de formación de microgeles, 5 min de lisis, 15 min de lavado y deshidratación y 10 minutos de secado y tinción) y entre 5 y 15 minutos de evaluación al microscopio, englobando un total de entre 3 h y 15 min y 3 h y 30 min.

2.3. Análisis estadístico

Los datos siguieron una distribución normal, como concluye el test de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó la *t* de Student para evaluar la homogeneidad. Se emplearon curvas ROC para establecer la concentración óptima de colistina para determinar la posible resistencia; y para calcular los valores de corte para la fragmentación del ADN y el daño en la pared celular en la predicción de dicha resistencia, utilizando el índice de Youden (J). Los datos se analizaron empleando el paquete estadístico SPSS 21 de IBM para Windows. Para la determinación del índice de Youden se utilizó el paquete estadístico Epidat 3.1 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España, y Panamerican Health Organization, Washington, DC). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

3. Resultados y discusión

Los métodos para la determinación de la fragmentación del ADN y el daño en la pared celular se evaluaron inicialmente incubando cuatro cepas isogénicas de *A. baumannii* con un amplio rango de concentraciones de colistina, entre 0 y 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En la cepa sensible ATCC 19606 ColS (CMI: 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), tras la incubación con la dosis más baja (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), el 13% de las células mostraron fragmentación en el ADN, mientras que el 65% se presentaron con la pared celular dañada. La incubación con la siguiente concentración (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dio

lugar al 20,5% de las células con el ADN fragmentado y el 93% (casi todas) con daño en la pared celular (figura 20).

La cepa derivada de laboratorio, resistente a colistina ATCC 19606 ColR (CMI: 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) posee una mutación de un solo nucleótido Ala227Val en *pmrB* (503), adyacente a la histidina conservada en el sitio de fosforilación (His228), que es crítica para la actividad fosfatasa. El resultado final es la adición de fosfoetanolamina al lípido A hepta-acilado (496). Aunque menos inmunogénica que la de tipo salvaje, esta modificación del LPS confiere resistencia a la colistina. A diferencia de la cepa original, en la cepa mutante se alcanzó sólo un 2,5% de células con ADN fragmentado tras la incubación con la concentración más alta de colistina (64 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y un 17% de células con la pared celular dañada tras la incubación con las dosis comprendidas entre 16 y 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (figura 20). En los cultivos de cepas sensibles donde se añade una concentración de colistina de 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o más alta, cuando se utilizó la lisis destinada a evaluar la integridad de la pared celular, se visualizó un discreto fondo de fragmentos de ADN entre las células, sin embargo, esto no ocurría cuando se empleaba la lisis para evaluar los nucleoides. Este fondo no se apreció en los cultivos de cepas resistentes.

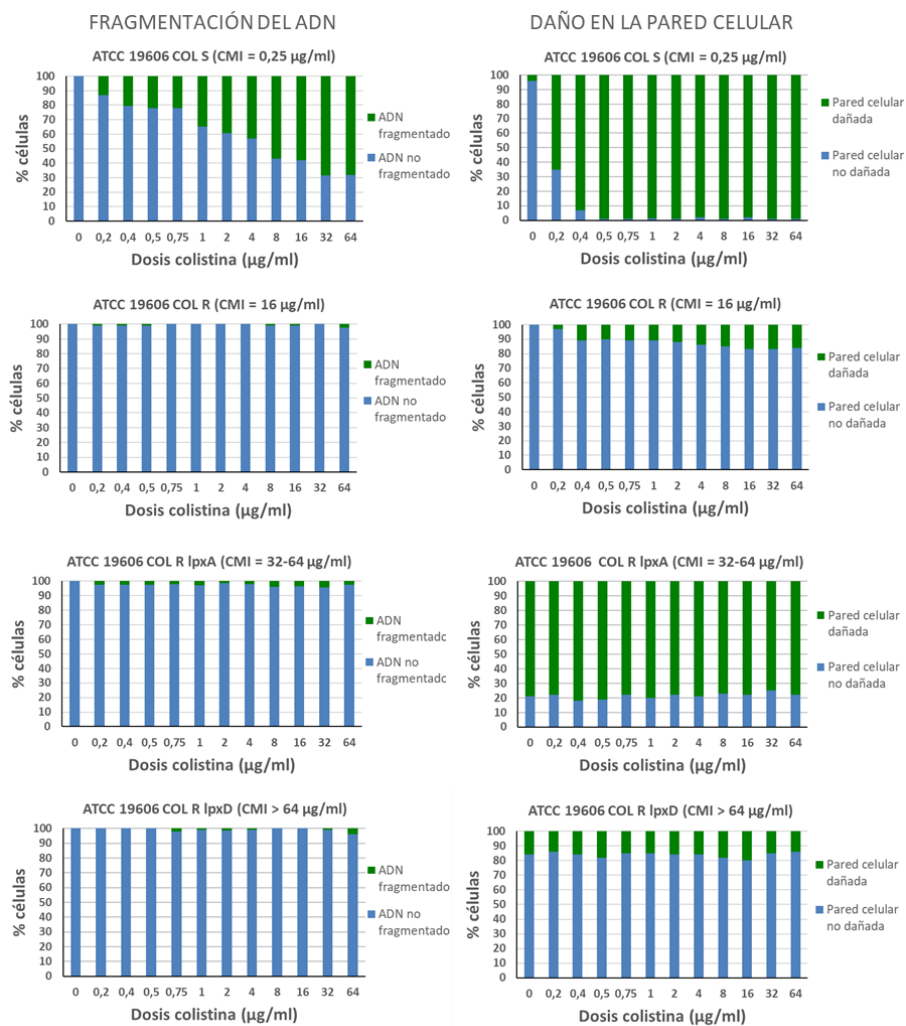


Figura 20. Distribución de la frecuencia de células con fragmentación del ADN (izquierda) y el nivel de daño de la pared celular (derecha) tras la incubación con concentraciones crecientes de colistina en cepas isogénicas de *A. baumannii* sensible (ATCC 19606 Col S) y con mecanismos de resistencia a colistina definidos (ATCC 19606 ColR, ATCC 19606 ColR *lpxA*, ATCC 19606 ColR *lpxD*).

También se estudiaron las cepas isogénicas ATCC 19606 ColR *lpxA* (CMI: 32 - 64 µg/ml) y ATCC 19606 ColR *lpxD* (CMI > 64 µg/ml). Estos derivados de laboratorio portan mutaciones en los genes

implicados en la biosíntesis del lípido A, *lpxA* y *lpxD*, respectivamente, conduciendo a la pérdida de producción de LPS y aumentando las CMI de colistina (504). Tras someterlas al protocolo, incluso en ausencia del antibiótico, estas cepas evidenciaron una disminución de la eficacia biológica y mostraron gran cantidad de fondo formado por fragmentos de ADN liberados espontáneamente al medio de cultivo. Este fondo se presentó con la solución de lisis que se utiliza para evaluar el daño en la pared celular, pero tiende a desaparecer cuando se usa la lisis más fuerte, destinada a liberar los nucleoides. En ambas cepas, no más de entre el 4 y el 4,5% de las células mostraron fragmentación del ADN, y no se observó relación entre el porcentaje de fragmentación y la dosis de colistina (figura 20). Es necesario indicar que el mutante *lpxA* mostró entre el 75 y el 80% de sus células con los nucleoides liberados cuando se incubaban con la solución de lisis destinada a evaluar la pared celular, tanto sin tratamiento antibiótico como, sin modificarse por las concentraciones crecientes de antibiótico (figura 20). Esto sugiere que dicha cepa posee una pared celular constitutivamente más débil. Este efecto espontáneo en la pared celular se detectó también en la cepa mutante *lpxD*, pero solo en entre el 14 y el 20% de las células, aunque también sin un incremento significativo con las concentraciones más altas (figura 20). La menor resistencia de la pared celular en el mutante *lpxA* concuerda con los cambios en su potencial de membrana, descritos anteriormente, que probablemente se debieron a modificaciones de la integridad de la membrana externa y a la pérdida de afinidad por la colistina (505).

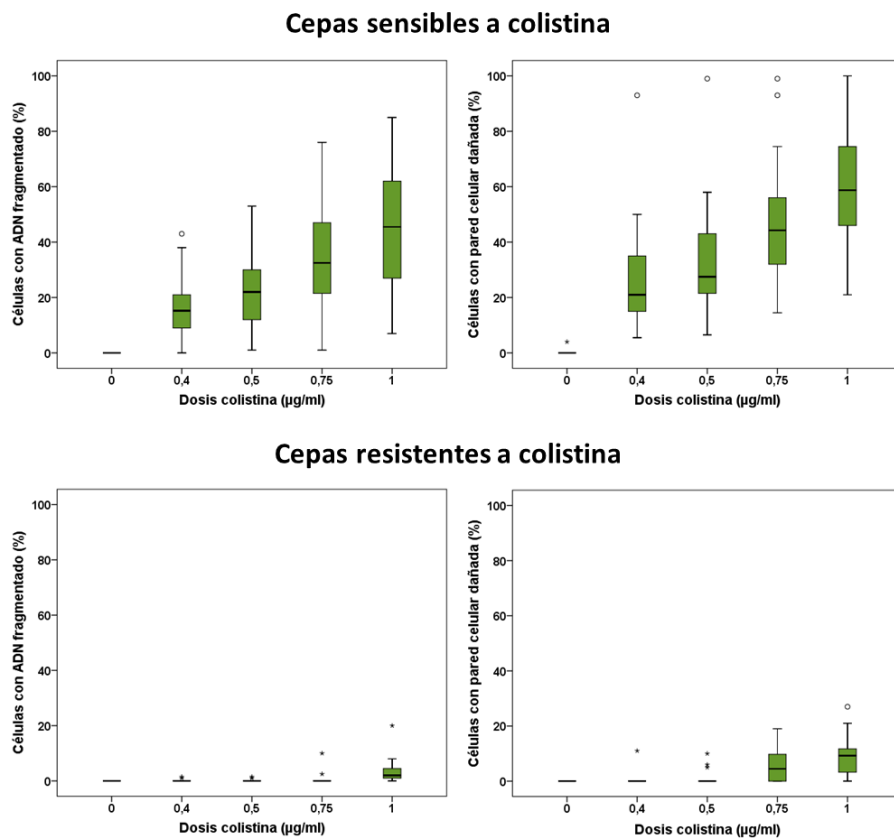


Figura 21. Diagrama de cajas y bigotes de la dosis-respuesta de cepas de *A. baumannii* sensible (arriba) y resistente (abajo) a colistina, para la fragmentación del ADN (izquierda) y daño en la pared celular (derecha). La línea horizontal en las cajas representa la mediana, la línea más baja de la caja el primer cuartil, y la línea superior de la caja, el tercer cuartil, y los bigotes (los extremos de las líneas verticales) representan los valores máximo y mínimo. Los puntos fuera de las cajas se corresponden con valores anormalmente altos.

Es poco probable que las cepas de *A. baumannii* sin LPS puedan sobrevivir en la naturaleza debido a su baja eficacia biológica. Además, su posible virulencia debería verse muy comprometida. En ningún caso, estas cepas se detectaron mediante la técnica de evaluación del daño en la pared celular, mostrando gran cantidad de fragmentos de

ADN en el fondo y exhibiendo paredes celulares débiles, incluso en ausencia de tratamiento con colistina. Las cepas resistentes a colistina en la naturaleza deberían relacionarse como más próximas a ATCC 19606 ColR, que a cepas sin LPS ya que ATCC 19606 ColR muestra un LPS modificado en la membrana celular externa. En consecuencia, y teniendo en cuenta los resultados de las cepas ATCC 19606 sensible y la ATCC 19606 ColR resistente, las técnicas para la detección de la fragmentación del ADN y el daño en la pared celular, parecen adecuadas para hacer una distinción rápida entre cepas de *A. baumannii* sensibles y resistentes a colistina. El ensayo basado en la integridad de la pared celular parece especialmente discriminativo. En un intento de validación cuantitativa, se estudiaron 66 cepas mayoritariamente clínicas, 50 susceptibles y 16 resistentes según los criterios del CLSI. El rango de CMI de las cepas estaba comprendido entre 0,03 y >32 µg/ml y se distribuía de modo equilibrado.

La figura 21 muestra los niveles de daño del ADN y la pared celular tras la incubación con concentraciones crecientes de colistina hasta 1 µg/ml en una cepa sensible y otra resistente. En las figuras 22 y 23 se muestran imágenes representativas del daño en el ADN y del daño en la pared celular, respectivamente, para cepas con CMI de 0,03 a 0,25 µg/ml; 16 µg/ml y >32 µg/ml. A diferencia de las cepas sensibles, casi todas las cepas resistentes muestran un pequeño daño, y ese daño moderado se aprecia únicamente en un número reducido de células tras la incubación con la concentración más elevada. En las cepas sensibles, aparecen más células con daño en la pared celular que con afectación a nivel del ADN, para cada concentración de colistina (test *t* de Student, $p < 0,001$). Esto también ocurre en las cepas resistentes

tras la incubación con concentraciones de colistina de 0,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p = 0,002$) y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0,001$).

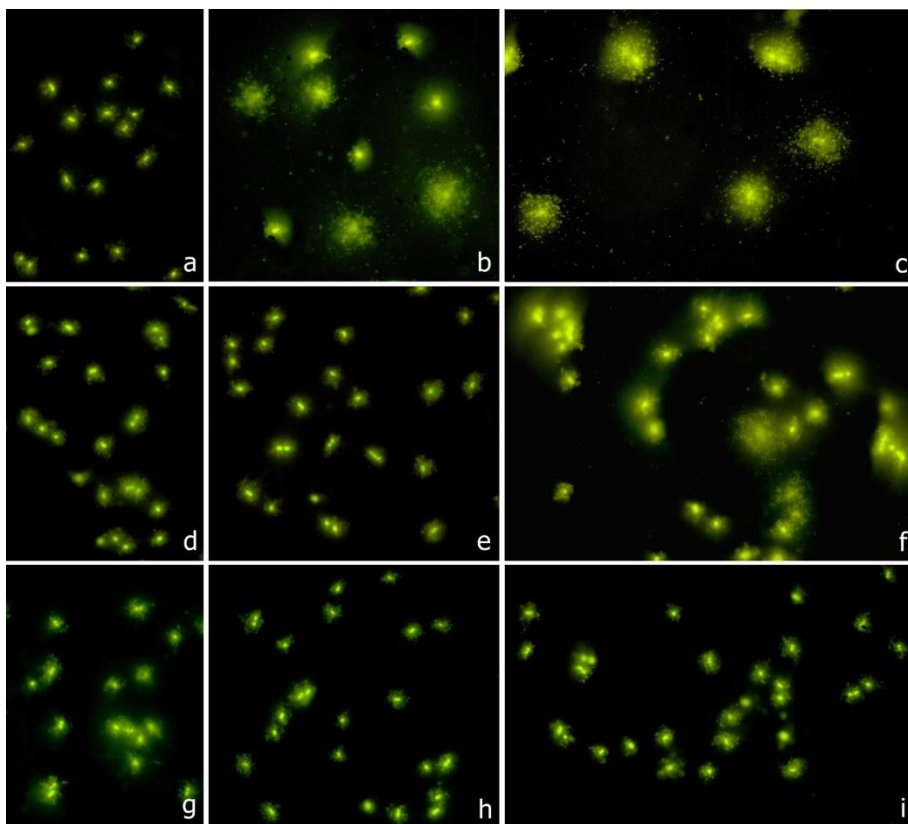


Figura 22. Tres cepas clínicas representativas de *A. baumannii*, incubadas con colistina durante 60 min con 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (primera columna, **a, d y g**); 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (segunda columna, **b, e, h**) y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (tercera columna, **c, f, i**). Las bacterias fueron procesadas para determinar la fragmentación del ADN evaluada a través de la difusión de puntos de ADN desde el nucleóide. Primera fila (**a, b, c**) cepa sensible (CMI = 0,03 a 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$); segunda fila (**d, e, f**), cepa resistente (CMI = 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$); tercera fila (**g, h, i**) cepa altamente resistente (CMI > 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La fragmentación de los nucleóides se visualizó en la cepa sensible tras 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (40% de células afectadas) y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (80% de células afectadas). En la cepa resistente, solo se detectaron un 21% de células dañadas después de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los nucleóides aparecían siempre prácticamente intactos en la cepa, altamente resistente (2% de células afectadas tras 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

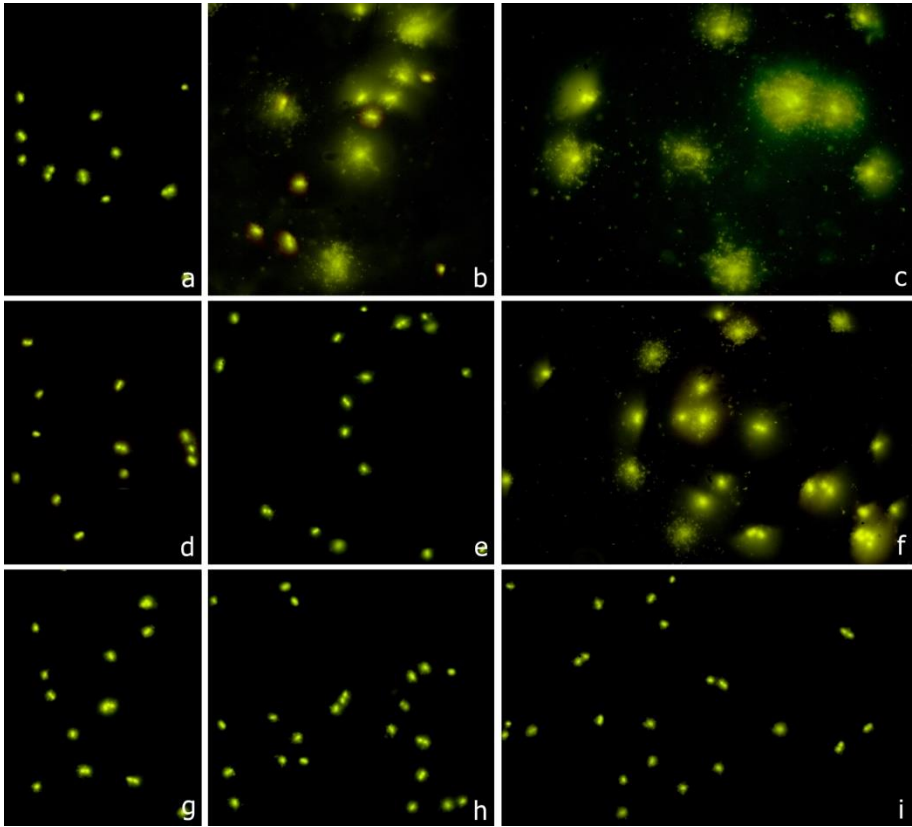


Figura 23. Tres cepas clínicas representativas de *A. baumannii*, incubadas con colistina durante 60 min con 0 µg/ml (primera columna, **a, d, g**); 0,5 µg/ml (segunda columna, **b, e, h**) y 1 µg/ml (tercera columna, **c, f, i**). Las bacterias fueron procesadas para determinar los efectos en la pared celular a través de la relajación del nucleóide tras el procesado técnico. Primera fila (**a, b, c**) cepa sensible (CMI = 0,03 a 0,25 µg/ml); segunda fila (**d, e, f**), cepa resistente (CMI = 16 µg/ml); tercera fila (**g, h, i**) cepa altamente resistente (CMI > 32 µg/ml). La liberación de los nucleoides fue evidente en la cepa sensible tras 0,5 µg/ml de colistina (41% de células afectadas) y 1 µg/ml (100% de células afectadas) pero en la cepa resistente, la frecuencia fue más baja incluso con 1 µg/ml (31% de células dañadas). Se visualizó un discreto fondo de fragmentos de ADN extracelular en los cultivos afectados por la colistina. La cepa de *A. baumannii* altamente resistente casi siempre mantiene su apariencia morfológica (2% de células afectadas tras 1 µg/ml).

Los estudios anteriores realizados evaluando esta tecnología se centraban en antibióticos cuya diana principal es el ADN, como las quinolonas, que producen la fragmentación del mismo (467, 477), o la pared celular, como los betalactámicos que inhiben la síntesis del peptidoglicano (468). En estos casos, los resultados fueron cualitativos, afectación *versus* no afectación, presentándose prácticamente la totalidad de la población dañada o no. Además, los datos respecto a la sensibilidad se obtuvieron después de la incubación de las bacterias con la concentración del punto de corte del CLSI para sensibilidad. En el caso de la colistina, ni el ADN ni la pared celular son la diana primaria del antibiótico. Aun así, se detectó fragmentación del ADN y daño en la pared celular, y esto ocurre sólo en una fracción de las células, la cual va aumentando con la concentración de colistina. Este daño debería de ser secundario, tras un efecto primario sobre el lípido A y la disrupción de la membrana celular con la consecuente alteración de la permeabilidad (491–493). Una posibilidad es que el daño en el ADN y en la pared celular sean colaterales a la producción de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el proceso de muerte celular, como se ha referido tras tratamientos con antibióticos bactericidas como betalactámicos y quinolonas (506). Dada la naturaleza cuantitativa de este daño en la población, incluso las cepas resistentes pueden mostrar una fracción de células afectadas en el ADN y/o la pared celular cuando se incuban con concentraciones correspondientes a los puntos de corte del CLSI para la resistencia. Una mejor discriminación entre cepas sensibles y resistentes podría lograrse con la incubación con concentraciones más bajas, ya que

producen células dañadas con una frecuencia mucho mayor en las cepas sensibles que en las resistentes.

Dado que el objetivo principal del test rápido es identificar con fiabilidad cepas resistentes, se buscó la concentración de colistina y la ratio de daño en la pared celular y en el ADN que distinguiesen de modo óptimo cepas sensibles de resistentes. Con este propósito, calculamos curvas ROC para cada dosis y las analizamos con el objetivo de obtener un 0% de falsos negativos, ya que la situación menos deseable es administrar el antibiótico a un paciente infectado con una cepa resistente, erróneamente identificada por el test rápido como sensible. Las curvas ROC fueron excelentes para cada dosis de colistina analizada, pero la incubación con una concentración de 0,5 µg/ml se identificó como la más discriminativa, con valores del área bajo la curva (AUC) similares para la fragmentación del ADN y para el daño de la pared celular: $0,998 \pm 0,003$ ($p = 0,0001$) (intervalo de confianza (IC) al 95% para el daño en el ADN de entre 0,993 y 1,000, y para el daño en la pared celular de entre 0,991 y 1,000). Los valores de corte óptimos fueron 8,5% y 11% para la fragmentación del ADN y el daño en la pared celular, respectivamente. Esto dio lugar al deseable 0% de falsos negativos en ambos casos, es decir, al 100% de sensibilidad (IC al 95% para daño en el ADN y la pared celular; 0,969 a 1,000). Además, la ratio de falsos positivos, es decir, que una cepa sensible sea identificada por el test como resistente, fue del 10% para la fragmentación del ADN y solo del 4% para el daño en la pared celular, es decir, se alcanza un 90% y un 96% de especificidad respectivamente (IC 95% para el daño en el ADN de 0,807 a 0,993 y para la afectación de la pared celular de 0,896 a 1,000). Por

consiguiente, los valores del índice de Youden fueron de 0,90 y 0,96 para la fragmentación del ADN y el daño en la pared celular, respectivamente (IC 95% para el daño en el ADN de 0,82 a 0,98 y para el daño en la pared celular de 0,91 a 1,01).

En conclusión, tanto la fragmentación del ADN como el daño en la pared celular son parámetros excelentes para la discriminación de cepas sensibles y resistentes, pero el segundo ensayo parece ser más específico. La obtención de un porcentaje de bacterias con la pared celular dañada $\leq 11\%$ tras una incubación con 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colistina identifica cepas resistentes de *A. baumannii* con un 100% de sensibilidad y un 96% de especificidad según el criterio del CLSI. El ensayo requiere de 1 h de incubación con colistina a concentraciones de 0 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 min de manipulación técnica, y entre 5 y 15 minutos de recuento para evaluar entre 200 y 500 células; un total aproximadamente de 2 h. Si las bacterias no están en fase de crecimiento exponencial, es recomendable una incubación previa de 90 min en medio Mueller-Hinton, para alcanzar la fase exponencial antes de la adición de colistina. Esto también elimina la posible existencia de células con ADN fragmentado y daño en la pared celular en la dosis control con 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Teniendo en cuenta esto, los resultados podrían estar disponibles en 3 h 30 min. Para validar los resultados es adecuado procesar simultáneamente una cepa control sensible y una resistente. En comparación con el proceso rutinario de microdilución automática, esta nueva tecnología es mucho más rápida, 3 h 30 min frente a 6-8 h, y permite la evaluación célula a célula, por lo que se podrían determinar la heterogeneidad en la inducción del daño y la evolución con el tiempo, la heterorresistencia o fenómenos

relacionados. Por otro lado, la metodología es manual o semiautomática y requiere de un microscopio de fluorescencia, así como de un contador celular. Más adelante podría ser fácilmente automatizada mediante un microscopio motorizado acoplado a una cámara digital y un programa de análisis de imagen. Por último, el test se limita a la colistina y algunos otros antibióticos previamente validados (466–468, 477), a diferencia de los paneles de microdilución comerciales que evalúan de 15 a 20 antibióticos. Sin embargo, en el futuro se prevé que se vayan evaluando y validando gran variedad de antibióticos, para su incorporación en el test Micromax.

Este es un procedimiento fiable, rápido y simple para la determinación de resistencia a un antibiótico relevante como la colistina, en cepas clínicas de *A. baumannii*. Esto puede ayudar a facilitar la administración de una terapia antibiótica temprana adecuada en casos de infecciones causadas por *A. baumannii* que constituyen una amenaza para la vida y promover el uso responsable de esta opción terapéutica, preservándola y evitando la diseminación de resistencias.

Capítulo IV

**Detección rápida de resistencia a
antibióticos en bacterias
Gram-negativas a través de la
evaluación de cambios en la
morfología celular.**

Resumen:

Los test rápidos de sensibilidad antimicrobiana tienen el potencial de mejorar los resultados de los pacientes y reducir los costes asociados a la atención sanitaria. En este estudio, se evaluó la capacidad de un ensayo innovador basado en la elongación celular tras la exposición a un antibiótico (ceftazidima), para detectar con rapidez resistencias en bacterias Gram-negativas. El ensayo fue utilizado para detectar resistencias en una gran colección de cepas que incluyen 320 aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, 171 de *Klebsiella pneumoniae* y 212 de *Pseudomonas aeruginosa*, y los resultados se compararon con los que se obtuvieron utilizando los métodos de evaluación de susceptibilidad antimicrobiana estándar. El ensayo identificó las cepas resistentes a ceftazidima con un 100% de sensibilidad y especificidad para *A. baumannii*, con un 100% de sensibilidad y un 97,2% de especificidad para *K. pneumoniae* y 82,3% de sensibilidad y 100% de especificidad para *P. aeruginosa*. Hay que destacar que los resultados fueron obtenidos en 1 hora y 15 minutos partiendo de cultivos en crecimiento exponencial. Este estudio demuestra que los cambios en la longitud celular están altamente correlacionados con la susceptibilidad antibiótica fenotípica determinada empleando los métodos de evaluación de sensibilidad convencionales. Por lo tanto, este trabajo proporciona una evidencia de que se pueden emplear los cambios en la morfología celular como base para la detección rápida de resistencia a antibióticos y facilita también un punto de partida para el desarrollo de diagnósticos rápidos e innovadores para la detección de resistencia antibiótica.

1. Introducción

Las enfermedades nosocomiales multirresistentes se asocian con una alta mortalidad y su manejo clínico es complicado por la falta de antibióticos que conserven una actividad apropiada frente a estas cepas infecciosas (24). Con frecuencia, el tratamiento de estas enfermedades requiere la administración de una terapia antibiótica empírica en ausencia de un diagnóstico microbiológico definitivo que identifique el agente causante de la infección y su perfil de resistencias. Una vez que se obtiene la información microbiológica a cerca de la susceptibilidad/resistencia de la bacteria causante de la infección, un proceso que generalmente requiere entre 24 y 48 horas, se puede aplicar el tratamiento antibiótico dirigido. En este contexto, las técnicas que permitan la caracterización rápida de perfiles de resistencia facilitarían la administración temprana de la terapia adecuada, con actividad confirmada contra la cepa infectante (507). Esto es importante dado que hay estudios que muestran que una disponibilidad temprana de los resultados de los test de sensibilidad puede mejorar los resultados de los pacientes (508–510) y reducir el número de pruebas de laboratorio y de procesos invasivos que se llevan a cabo (470, 511). Además, los diagnósticos rápidos tienen la capacidad de facilitar el uso eficiente de los antibióticos y prevenir la aparición y transmisión de resistencias antimicrobianas (512). Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado un ensayo basado en microscopía de fluorescencia que es capaz de detectar rápidamente bacterias Gram-negativas con resistencia a ciprofloxacino, un antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas, y a meropenem, un betalactámico (467, 477). Estos métodos detectan resistencia

visualizando la fragmentación del ADN tras la exposición a ciprofloxacino y la dispersión del nucleóide que sucede tras la exposición a antimicrobianos que dañan la pared celular. Es de gran importancia que, los resultados de las pruebas de sensibilidad que emplean este método correlacionan estrechamente con los resultados obtenidos usando los métodos de evaluación de susceptibilidad tradicionales.

Hace tiempo que se sabe que las células bacterianas de múltiples especies adoptan forma filamentosa en respuesta a distintos tipos de estrés ambiental, incluyendo el daño en el genoma (513), los efectores de inmunidad del huésped (514) y las limitaciones nutricionales (515). Se ha sugerido que este cambio en la morfología celular se debe a la detención de la división celular en presencia de una expansión continua del volumen celular y que este fenotipo es un componente de una respuesta protectora que incrementa la supervivencia bajo condiciones de estrés (516). La exposición a varias clases de antibióticos también induce alargamiento (515–517). En este trabajo, empleamos ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación, para evaluar la hipótesis de que los cambios en la morfología bacteriana en respuesta a la exposición a antibióticos, pueden emplearse para diferenciar de modo rápido cepas resistentes de sensibles en varias especies de Gram-negativos. Nuestros resultados indican que la monitorización de la morfología celular tras la exposición a antibióticos puede diferenciar rápidamente cepas resistentes y susceptibles coincidiendo con los métodos de evaluación de sensibilidad estandarizados y por lo tanto puede proporcionar una

base para técnicas rápidas y novedosas que valoren la susceptibilidad en infecciones bacterianas.

2. Material y métodos

2.1. Cepas bacterianas y determinación de la concentración mínima inhibitoria

Entre 2001 y 2013 se obtuvieron del Hospital Universitario de A Coruña aislados clínicos de: *Acinetobacter baumannii* (n=320), *Pseudomonas aeruginosa* (n=212) y *Klebsiella pneumoniae* (n=171). Las CMI's fueron determinadas por microdilución automática (MicroScan WalkAway; Siemens) y confirmadas mediante Etest (AB Biodisk; BioMerieux), siguiendo las instrucciones del fabricante, y los resultados se interpretaron según los criterios del CLSI (517).

2.2. Ensayo de la elongación celular

Se inocularon 2 ml de medio líquido Mueller-Hinton con bacterias previamente cultivadas en placas con el mismo medio sólido y se incubaron a 37 °C durante 90 minutos. A continuación, este cultivo bacteriano se diluyó a una DO₆₀₀ de 0,1 en medio M-H y se incubó a 37 °C en tubos de 200 µl con la concentración correspondiente de ceftazidima, durante 60 minutos en un volumen final de 30 µl. Para evaluar la longitud celular, se empleó un protocolo descrito previamente (518, 519). A modo de resumen, tras la incubación con el antibiótico, las bacterias se diluyeron a una concentración de $1 \cdot 10^7$ microorganismos/ml en medio Mueller-Hinton, se incluyeron en un microgel fino sobre un portaobjetos, se incubaron en concentraciones crecientes de etanol, se secaron, se tiñeron con el

fluorocromo SYBR Gold, y se examinaron bajo microscopía de fluorescencia. Este proceso da lugar a imágenes totalmente nítidas que permiten establecer la longitud celular con gran exactitud. En todos los estudios, se utilizó análisis de imagen digital (Apogee KX32 ME camera and Visilog 5.1 software; Noesis) para evaluar al menos 200 células por ensayo. El alargamiento fue definido como un incremento en la longitud de al menos 1,5 veces comparado con las células sin tratar de la misma cepa. Se empleó esta referencia para evitar el sesgo debido a las diferencias intrínsecas de la longitud celular entre cepas.

2.3. Determinación de resistencias mediante la elongación celular

La relación entre la longitud celular y la concentración de los puntos de corte del CLSI para ceftazidima se estableció empíricamente después de procesar numerosas cepas de las distintas especies bacterianas, comprendiendo un amplio rango de CMIs, incluyendo cepas sensibles, intermedias y resistentes. Se utilizaron numerosos aislados con CMIs cerca del punto de corte de sensibilidad y resistencia del CLSI. Se determinaron las concentraciones de antibióticos que incrementaban la longitud celular en las cepas sensibles, pero no en las intermedias y resistentes, y también las que lo lograban solo en las sensibles e intermedias. Las concentraciones se optimizaron de tal forma que una cepa categorizada como sensible siguiendo los criterios del CLSI, debe manifestar alargamiento celular tras la incubación con la concentración más baja, establecida como el punto de corte de sensibilidad, para el parámetro alargamiento. Así mismo, las células de una cepa intermedia (según los criterios del CLSI) no deben mostrar alargamiento tras la incubación con la dosis más baja, establecida como

punto de corte de sensibilidad, pero se verán alargadas con la concentración establecida como punto de corte de resistencia para el parámetro de elongación celular. Finalmente, una cepa clasificada como resistente siguiendo los criterios del CLSI no debería de aparecer alargada tras la aplicación de las concentraciones de antibióticos empleadas. Los test de sensibilidad llevados a cabo utilizando la técnica de elongación celular y mediante los métodos tradicionales, fueron realizados por investigadores independientes, y los resultados se compararon al final del estudio.

3. Resultados

El alargamiento celular tras la exposición antibiótica fue detectado de forma fácil y reproducible, como se puede observar en la figura 24, en la que se presentan los cambios en la longitud celular de tres cepas de *A. baumannii* incubadas con dosis crecientes de ceftazidima (0, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (se analizaron 200 células por concentración evaluada). Se corresponden con una cepa sensible (CMI: 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), una intermedia (CMI: 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y una resistente (CMI: 48 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En la cepa sensible, el incremento en la longitud con respecto al cultivo control sin antibiótico se evidenció desde la concentración más baja utilizada, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La cepa intermedia no mostró alargamiento celular después de la incubación con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pero sí fue significativo tras 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y continuó aumentando progresivamente, a medida que lo hacían las dosis de la cefalosporina. No se apreció elongación celular significativa en la cepa resistente con ninguna de las concentraciones evaluadas. Se obtuvieron resultados similares con cepas representativas sensible, intermedia y resistente de

K. pneumoniae y *P. aeruginosa*, que se muestran también en la figura 24. En estos casos, las dosis de ceftazidima empleadas fueron mucho más bajas que en *A. baumannii*, como se explica más adelante. La figura 25 muestra las imágenes al microscopio de las tres cepas de *A. baumannii* con las tres dosis de ceftazidima indicadas. Es importante destacar que, al comenzar con colonias bacterianas aisladas en medio sólido, el tiempo total hasta obtener el resultado final es entre 3,5 y 4 horas, incluyendo 30 minutos de procesado técnico.

Para *A. baumannii*, los puntos de corte de sensibilidad y resistencia del CLSI para ceftazidima son respectivamente ≤ 8 y ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$. Empleando el ensayo de elongación celular, encontramos que las concentraciones de ≤ 2 y ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ se corresponden con las dosis de corte de sensibilidad y resistencia, respectivamente. Es decir, las cepas sensibles aparecen alargadas tras la incubación con 2 y 8 $\mu\text{g/ml}$ y las intermedias solo después de incubar con 8 $\mu\text{g/ml}$, mientras que las cepas resistentes nunca sufren alteraciones en la longitud celular con ninguna de las dos concentraciones (figura 25). Para validar el ensayo se procesaron 320 aislados clínicos de *A. baumannii*. Atendiendo a las CMIs obtenidas por procedimientos estándar y las guías del CLSI, 51 cepas fueron consideradas sensibles, 35 intermedias y 234 resistentes a ceftazidima. Utilizando el criterio de alargamiento con sus respectivas dosis de corte, determinadas empíricamente, todas las cepas se identificaron correctamente con un 100% de sensibilidad y especificidad (tabla 1).

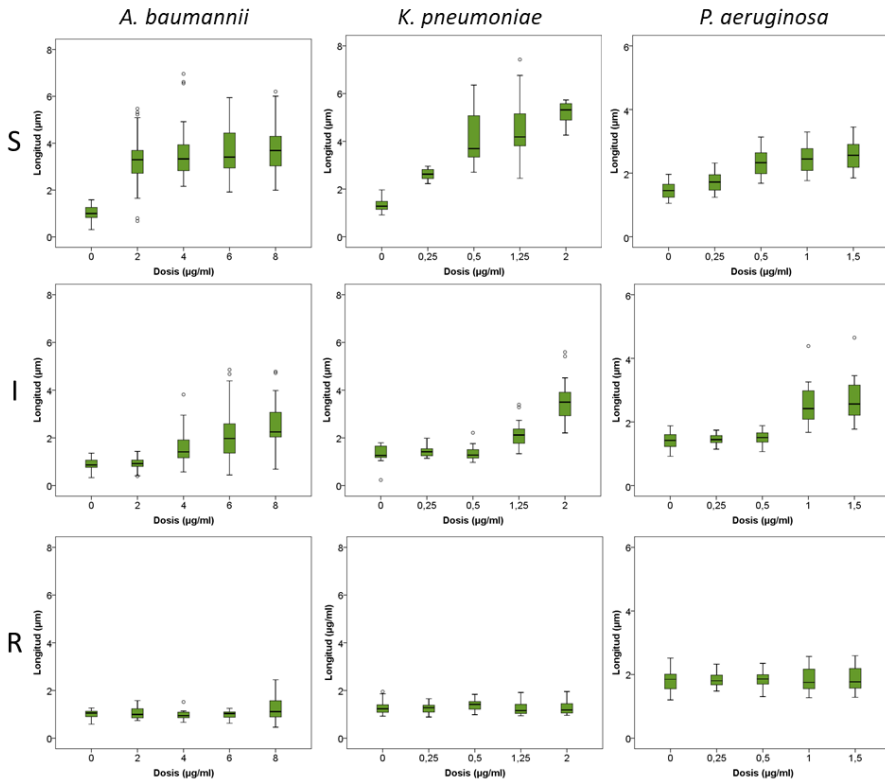


Figura 24. Modificación en la longitud celular con concentraciones crecientes de ceftazidima en cepas representativas sensibles (S; arriba), intermedias (I; medio) y resistentes (R; abajo) de *Acinetobacter baumannii* (S: CMI 2,5 µg/ml; I: CMI 24 µg/ml; R: CMI 48 µg/ml), *Klebsiella pneumoniae* (S: CMI 0,047 µg/ml; I: CMI 8 µg/ml; R: CMI 256 µg/ml) y *Pseudomonas aeruginosa* (S: CMI 8 µg/ml; I: CMI 16 µg/ml; R: CMI 64 µg/ml). Las concentraciones de ceftazidima se indican en el eje horizontal (µg/ml), mientras que la longitud celular se muestra en el eje vertical (µm). Los datos se presentan como diagramas de cajas y bigotes. La línea horizontal en la caja representa la mediana, la línea inferior de la caja es el primer cuartil, la línea superior de la caja es el tercer cuartil, y los bigotes (el final de las líneas verticales) son valores de datos máximos y mínimos. Los puntos fuera de la caja corresponden a valores atípicos. Las células aparecen progresivamente más largas en las cepas sensibles, pero sin cambios significativos en ninguna dosis en las cepas resistentes.

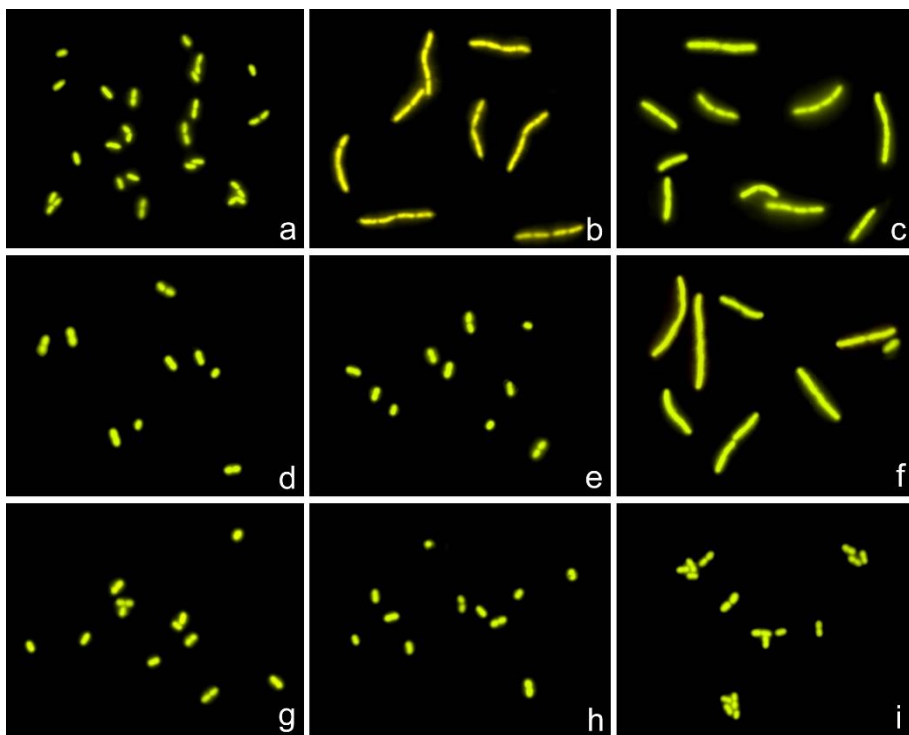


Figura 25. Cepas de *A. baumannii*, incubadas 1 hora con ceftazidima, incluidas en microgel sobre un portaobjetos, deshidratadas, teñidas con SYBR Gold, y observadas bajo microscopía de fluorescencia. *Primera columna izquierda (a, d, g):* control 0 µg/ml; *segunda columna (b, e, h):* 2 µg/ml; y *tercera columna (c, f, i):* 8 µg/ml. *Primera fila (a-c):* cepa sensible (CMI: 2,5 µg/ml); *segunda fila (d-f):* cepa intermedia (CMI: 12 µg/ml); y *tercera fila (g-i):* cepa resistente (CMI: 64 µg/ml). El alargamiento celular es evidente en la cepa sensible a partir de 2 µg/ml (b), en la cepa intermedia solo después de 8 µg/ml (f), mientras que la cepa resistente permanece sin cambios en la longitud celular.

Para *K. pneumoniae*, los puntos de corte de susceptibilidad y resistencia para ceftazidima son ≤ 4 y ≥ 16 µg/ml, respectivamente, mientras que en el ensayo de elongación celular se demostró que las concentraciones $\leq 0,5$ y $\geq 0,125$ µg/ml correlacionan con sensibilidad y resistencia. Se estudiaron ciento setenta y un aislados clínicos de *K. pneumoniae*, incluyendo según los criterios del CLSI, 107 sensibles, 19 intermedios y 45 resistentes a ceftazidima. Los resultados obtenidos

empleando el ensayo del alargamiento celular fueron altamente concordantes con los procedentes de los métodos clásicos. Las únicas excepciones fueron tres cepas sensibles caracterizadas como intermedias (dos) y resistente (una) mediante el test basado en la elongación celular, y dos cepas intermedias que se clasificaron como resistentes. Estos resultados indican que el ensayo basado en alargamiento es más conservador, con una sensibilidad de detección de cepas no-sensibles (intermedias y resistentes) del 100% y una especificidad del 97,2%. La tasa de falsos positivos fue del 2,8% y no se detectó ningún falso negativo de resistencia. El valor predictivo positivo fue del 95,5% y el valor predictivo negativo del 100%.

Para *P. aeruginosa* las concentraciones de los puntos de corte del CLSI de sensibilidad y resistencia a ceftazidima son ≤ 8 y ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Se determinó que cuando se emplea la elongación bacteriana, las concentraciones de los puntos de corte para el alargamiento celular, son mucho más bajas, $\leq 0,5$ y ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$. Cuando se evaluaron los 212 aislados de *P. aeruginosa*, 178 fueron identificados como sensibles, 18 como intermedios y 16 como resistentes a ceftazidima según las guías del CLSI. Todas las cepas sensibles fueron correctamente identificadas con el ensayo basado en la elongación. Sin embargo, seis cepas no-sensibles mostraron alargamiento después de ser incubadas con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de ceftazidima. Por lo tanto, el ensayo basado en la elongación celular mostró una sensibilidad del 82,3% y una especificidad del 100%. Mientras que la ratio de falsos positivos fue del 0% y el valor predictivo positivo del 100%, la ratio de falsos negativos y el valor predictivo negativo fue del 17,6% y 96,7%, respectivamente.

Tabla 1. Valores analíticos del ensayo del alargamiento celular para detectar la resistencia a ceftazidima en *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
Sensibilidad (%)	100	82,4	100
Especificidad (%)	97,2	100	100
Tasa de falsos positivos (%)	2,8	0	0
Tasa de falsos negativos (%)	0	17,7	0
Valor predictivo positivo (%)	95,5	100	100
Valor predictivo negativo (%)	100	96,7	100

4. Discusión

Este estudio demuestra que los cambios en la longitud celular se pueden emplear para detectar rápidamente resistencia a ceftazidima en tres especies Gram-negativas que de manera frecuente producen infecciones multirresistentes. Hasta donde nosotros sabemos, este es el primer estudio que ha utilizado la longitud celular para caracterizar sensibilidad a antibióticos y correlacionar los resultados con los métodos de evaluación estandarizados utilizando una gran colección de aislados clínicos. Es interesante destacar que, para las tres especies bacterianas evaluadas, la concentración de antibiótico requerida para inducir alargamiento celular fue inferior a los puntos de corte de resistencia definidos por el CLSI para los métodos de microdilución en medio líquido. Estos datos sugieren que los cambios fisiológicos ocurren en las células bacterianas a concentraciones que son subinhibitorias según las pruebas microbiológicas estándar. A favor de

esta idea, existen trabajos previos que han relatado que el alargamiento ocurre a concentraciones subinhibitorias de los antibióticos (518-520). Debemos destacar que en este estudio demostramos que el alargamiento celular a estas concentraciones subinhibitorias correlaciona con los resultados de las pruebas utilizando métodos estándar que definen los puntos de corte de resistencia empleando concentraciones de antibióticos más altas. Nuestros resultados indican que el ensayo del alargamiento fue en cierto modo menos sensible para detectar resistencia en aislados de *P. aeruginosa*; sin embargo, el mecanismo subyacente que genera esta diferencia respecto a *K. pneumoniae* y *A. baumannii*, no está claro.

Actualmente se están utilizando en clínica o se están desarrollando métodos para la detección rápida de resistencia a antibióticos en aislados bacterianos, tales como las pruebas basadas en ácidos nucleicos (ej: PCR y microarrays), métodos basados en espectrometría de masas y de secuenciación del genoma (507). Todos estos métodos tienen potencial para test rápidos de sensibilidad; sin embargo, en la mayoría de los casos, requieren más tiempo de procesamiento que los métodos tradicionales. Cabe destacar que, para aplicar todos estos métodos, se necesita determinar previamente el mecanismo de resistencia para poder llevar a cabo el test de sensibilidad; por ejemplo, para los métodos basados en microarrays y PCR es necesario conocer el gen/es que le confieren resistencia, y en los métodos basados en espectrometría de masas se deben caracterizar previamente el metabolito específico de interés o las proteínas que causan la resistencia. Por consiguiente, una limitación importante de estos métodos es que pueden no mostrar una alta sensibilidad para

detectar mecanismos de resistencia sin caracterizar. Aunque no ha sido empíricamente evaluado en este estudio, el ensayo de la elongación celular no depende del mecanismo de resistencia a ceftazidima, y puede, por lo tanto, ser capaz de detectar mecanismos de resistencia sin calificar, minimizando así los resultados falsos negativos. Una ventaja adicional es que la medición de la longitud de las células bacterianas se puede mecanizar utilizando un microscopio automático y un programa informático apropiado para la detección de cambios en la longitud celular. Por lo tanto, puede ser posible reducir la duración del protocolo llevado a cabo en este estudio.

Un aspecto elemental del método descrito en este estudio es su posible aplicabilidad a otros antibióticos que no sean la ceftazidima. La actividad bactericida de la ceftazidima se debe a su unión específica a diferentes proteínas de unión a las penicilinas, inhibiendo el paso final de la transpeptidación necesario para la síntesis del peptidoglicano. Las principales dianas son: PBP1b, 1c, PBP2 y especialmente PBP3 (521, 522). Tienen baja afinidad por PBP4, dando lugar a una débil inducción de la β -lactamasa AmpC codificada cromosómicamente (523). Se han descrito numerosos mecanismos de resistencia para la ceftazidima, incluyendo la producción de enzimas que degradan el fármaco como las β -lactamasas, alteraciones de las dianas del antibiótico como las PBPs, descenso de la permeabilidad bacteriana debida a alteraciones en las porinas, e incremento de los mecanismos de expulsión de la droga (524). Aunque se ha citado que la elongación celular ocurre tras la exposición a múltiples antibióticos, (518–520) no se había expuesto que el alargamiento correlaciona con la sensibilidad fenotípica determinada por métodos estándar para estos antibióticos.

Puntualizamos, sin embargo, que evaluamos la capacidad de la técnica del alargamiento celular para detectar resistencia a ciprofloxacino en estudios preliminares. Nuestros datos indicaron que la elongación celular no se podría utilizar de forma fiable para detectar resistencia a ciprofloxacino. Esto puede ser debido al hecho de que el ciprofloxacino no tiene como diana la biosíntesis de la pared celular. Con respecto a antibióticos adicionales, se requieren más pruebas empíricas para determinar la aplicabilidad de esta técnica.

En resumen, demostramos que los cambios en la longitud celular correlacionan fuertemente con la sensibilidad fenotípica a ceftazidima determinada mediante los métodos de evaluación de susceptibilidad estándar. Por lo tanto, este estudio proporciona una prueba de concepto de que los cambios en la morfología celular se pueden utilizar como base para la detección rápida de la resistencia a los antibióticos.

Capítulo V

**Evaluación rápida de resistencia a
antibióticos inhibidores de la
síntesis de proteínas en los
patógenos Gram-positivos,
Enterococcus faecalis y
Streptococcus pneumoniae, basada
en la valoración de la respuesta
lítica.**

Resumen:

Se desarrolló un ensayo novedoso para la determinación rápida de resistencia a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas para los patógenos Gram-positivos, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae*. Con este propósito, se obtuvo una respuesta lítica tras una breve incubación con lisozima o una mezcla de lisozima, Tritón X-100 y EDTA para *E. faecalis* (n=82) y *S. pneumoniae* (n=51), respectivamente. La lisis fue cuantificada por la visualización de los nucleoides liberados. Las bacterias sensibles al antibiótico, tratadas con las dosis de los puntos de corte del CLSI, de eritromicina, azitromicina o doxiciclina que inhiben la síntesis de proteínas, mostraron una gran reducción de células lisadas con respecto al control, esto es, incubadas sin antibióticos. Sin embargo, la reducción de la lisis celular fue mucho más baja en las cepas no sensibles, en las que el antibiótico no inhibe adecuadamente la síntesis de proteínas. Los análisis ROC mostraron que una reducción de $\geq 35,6\%$ y $\geq 40,4\%$ discrimina cepas sensibles y no sensibles para eritromicina y doxiciclina, respectivamente, en *E. faecalis*, mientras un valor $\geq 20,0\%$ es adecuado para ambos macrólidos y doxiciclina, en *S. pneumoniae*. Las cepas resistentes se identificaron en 90-120 min con una sensibilidad y especificidad entre el 91,7% y el 100%. Esto es una prueba de concepto de que la evaluación de la respuesta lítica puede ser un test rápido y eficiente para la determinación de resistencias a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas.

1. Introducción

Enterococcus faecalis y *Streptococcus pneumoniae* son patógenos Gram-positivos que pueden causar enfermedades que constituyen una amenaza para la vida. *E. faecalis* es el tercer patógeno más frecuentemente aislado en el entorno hospitalario, causando principalmente bacteriemia, endocarditis e infecciones del tracto urinario (66, 67). *S. pneumoniae* es el patógeno bacteriano más frecuente responsable de neumonía adquirida en la comunidad y también puede causar sinusitis paranasal, otitis media, meningitis, osteomielitis, bacteriemia y otras infecciones (140).

Ambos patógenos muestran un incremento progresivo de resistencia a muchos de los antibióticos más comúnmente empleados, incluyendo la mayoría de los inhibidores de las síntesis de proteínas de bacterias, tales como macrólidos y tetraciclinas (525, 526). Los antibiogramas estándar normalmente requieren sobre 24 h para obtener resultados. En situaciones urgentes, la información rápida con respecto a la resistencia a antibióticos puede facilitar un uso más temprano de los antimicrobianos apropiados y mejorar el resultado de los pacientes, disminuyendo los costes de la atención sanitaria y reduciendo la diseminación de resistencias a antibióticos (512). *S. pneumoniae* lisa su pared celular después de añadir detergentes tales como el desoxicolato o Tritón X-100, a través de la activación de la autolisina LytA (133, 527). Además, las autolisinas están involucradas en la acción bactericida de la lisozima en *E. faecalis*. Esta respuesta autolítica es independiente de su actividad muramidasa y depende de su carácter catiónico (528, 529). En este trabajo proporcionamos

evidencias de que la respuesta autolítica está influenciada por la síntesis proteica ribosómica, pudiendo estandarizarse para la determinación rápida de sensibilidad o resistencia a antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas.

2. Material y métodos

2.1. Cepas bacterianas

Se obtuvieron cepas clínicas del Hospital Universitario de A Coruña y del Instituto Nacional de Salud Carlos III (Madrid, España). Las CMI's se determinaron mediante microdilución automatizada (MicroScan Walkaway; Siemens).

Los aislados de *E. faecalis* (n=82) se cultivaron en agar Mueller-Hinton a 37 °C durante 24 h. Una muestra se incubó en 2 ml de medio líquido M-H a 37 °C durante 2 h. Las bacterias se diluyeron a una DO₆₀₀ de 0,15 en medio líquido M-H y se incubaron a 37 °C en tubos de 200 µl con 0,5 µg/ml de eritromicina o 4 µg/ml de doxiciclina durante 75 min en un volumen final de 30 µl.

Los aislados de *S. pneumoniae* (n=51) fueron cultivados en placas de agar con 5% de sangre de oveja a 37 °C durante 24 h. Las bacterias se diluyeron a una DO₆₀₀ de 0,4 en medio Mueller-Hinton II suplementado con un 3% de sangre lisada de caballo e incubadas durante 60 min con 0,5 µg/ml de azitromicina, 0,25 µg/ml de eritromicina, o 0,25 µg/ml de doxiciclina. Las dosis de antibióticos son las indicadas por el CLSI como puntos de corte de sensibilidad en los antibiogramas estándar basados en microdilución (478).

2.2. Ensayo de lisis

Para *E. faecalis*, se añadió lisozima 1 mg/ml y se agitó durante 10 min a 37 °C. *S. pneumoniae* se incubó con 0,05% Tritón X-100, 2 mg/ml lisozima, y 25mM EDTA (TLE) durante 5 min a 37 °C. Se diluyó una alícuota de cada muestra hasta alcanzar una concentración de 5-10 millones de microorganismos/ml en medio Mueller-Hinton.

Se utilizó el prototipo Micromax®-Q (Halotech DNA SL) para evaluar la integridad de la pared celular, tal y como se describe (468, 477). De manera breve, se mezclan 30 µl la muestra diluida con agarosa líquida de bajo punto de fusión a 37 °C. Se dispensa una alícuota de 10 µl de la mezcla agarosa-muestra en un portaobjetos pretratado y se cubre con un cubreobjetos de 18x18mm. El portaobjetos se coloca sobre una bandeja fría para formar un microgel con las células intactas atrapadas en su interior. El cubreobjetos se retira e inmediatamente el portaobjetos se sumerge horizontalmente en 10 ml de la solución de lisis específica a temperatura ambiente, incubando durante 5 min para *E. faecalis* y 2 min para *S. pneumoniae*. Los portaobjetos se lavan con agua destilada durante 3 min, se deshidratan en frío (-20 °C) con concentraciones crecientes (70%, 90%, y 100%) de etanol durante 3 min cada uno, y se dejan secar en una estufa. Los portaobjetos secos se tiñen con 100 µl del fluorocromo SYBR Gold (Molecular Probes) diluido 1:400 en el tampón TBE (0,09 M Tris-borato, 0,002 M EDTA, pH 7,5) durante 2 min en oscuridad con un cubreobjetos. Tras un breve lavado en tampón fosfato pH 6,88 (Merk), se coloca un cubreobjetos de 24x60mm y los portaobjetos se visualizan bajo microscopía de fluorescencia, y se realiza un recuento de 500 bacterias por condición experimental. Eso se logra en 5-10 min, dependiendo de la densidad

celular en el microgel. Cuando las bacterias están lisadas, el nucleoide contenido en el interior está relajado y liberado en el microgel. La visualización del nucleoide celular es un signo fehaciente de lisis celular.

3. Resultados

Para establecer el procedimiento para *E. faecalis*, se incubaron una cepa sensible a eritromicina (CMI: 0,125 µg/ml) y una resistente (CMI >128 µg/ml) con eritromicina sola, lisozima sola, y eritromicina seguida de lisozima (figura 26). La incubación con eritromicina sola nunca dio lugar a modificaciones en la pared celular bacteriana con respecto a las células sin tratar (figura 26a, d). Sin embargo, después de la incubación con lisozima y solución de lisis, las cepas sensibles a eritromicina mostraron un alto porcentaje, esto es, 92,1% de células lisadas (células con el nucleoide relajado). Sin embargo, la proporción de células lisadas descendió a 3,9% cuando las cepas se incubaron con eritromicina previamente (figura 26b, c). En la cepa resistente a eritromicina, el 97,4% de las células aparecieron lisadas después de la incubación con lisozima. La incubación con eritromicina previa produjo sólo un sutil cambio en el porcentaje, esto es, 96,8% de células lisadas (figura 26e, f). Con *S. pneumoniae* se obtuvieron resultados similares (figura 27). En este caso, la lisozima mejoró la respuesta lítica de las bacterias frente al detergente (530, 531). Sin EDTA en la solución TLE, los nucleoides relajados aparecen como un campo de puntos dispersos de fragmentos de ADN, dificultando su recuento (figura 28a). La presencia de EDTA en la solución previene la mayoría de la fragmentación del ADN, por lo que los nucleoides liberados se

mantienen más conservados y se pueden realizar los recuentos de manera más precisa (figura 28b).

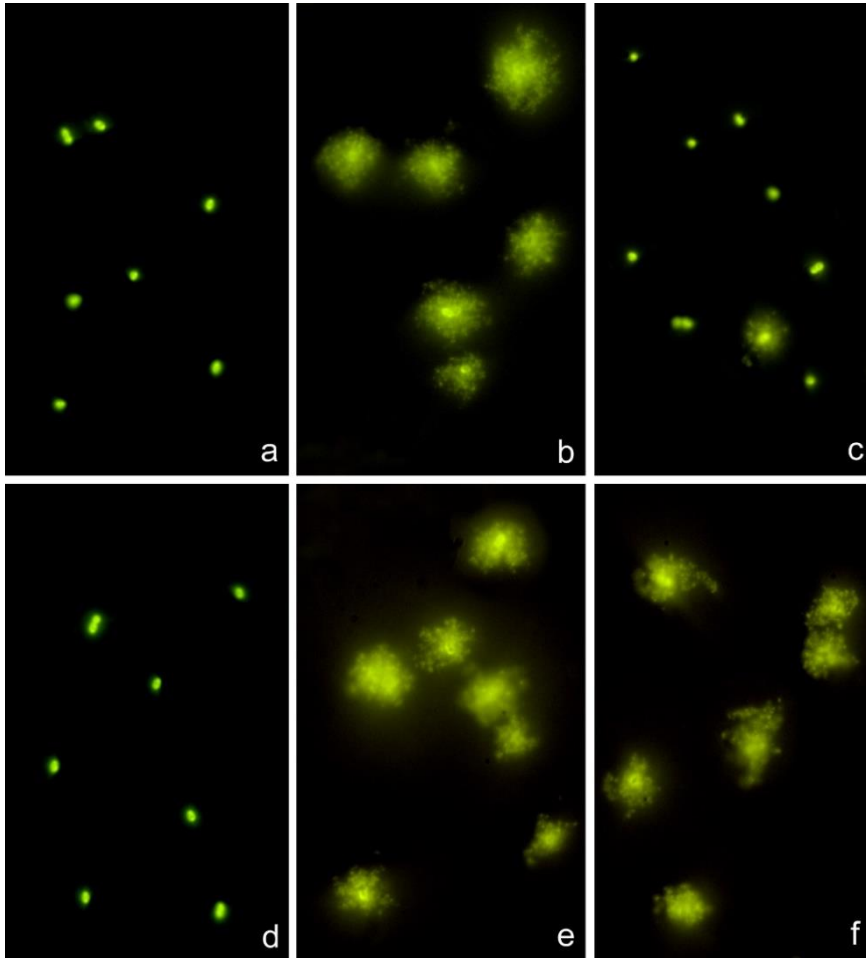


Figura 26. *Enterococcus faecalis* procesados con el ensayo Micromax® para evaluar la lisis celular a través de la visualización de nucleoides liberados. Las imágenes de arriba (**a-c**) corresponden a una cepa sensible a eritromicina (CMI 0,125 µg/ml) y las imágenes de abajo (**d-f**) a una cepa resistente a eritromicina (CMI >128 µg/ml). Se trataron alícuotas de cada cultivo con 0,5 µg/ml de eritromicina sola (**a, d**), con 1 mg/ml de lisozima sola (**b, e**), y con eritromicina antes de la incubación con lisozima (**c, f**). La lisozima y la posterior incubación con la solución de lisis dan lugar a lisis celular y la subsiguiente liberación de los nucleoides en la mayoría de las células en ambas cepas (**b, e**). Además, la incubación previa con eritromicina disminuyó en gran medida la proporción de células lisadas en la cepa sensible (**c**), pero no modificó la frecuencia de células lisadas en la cepa resistente a la eritromicina (**f**).

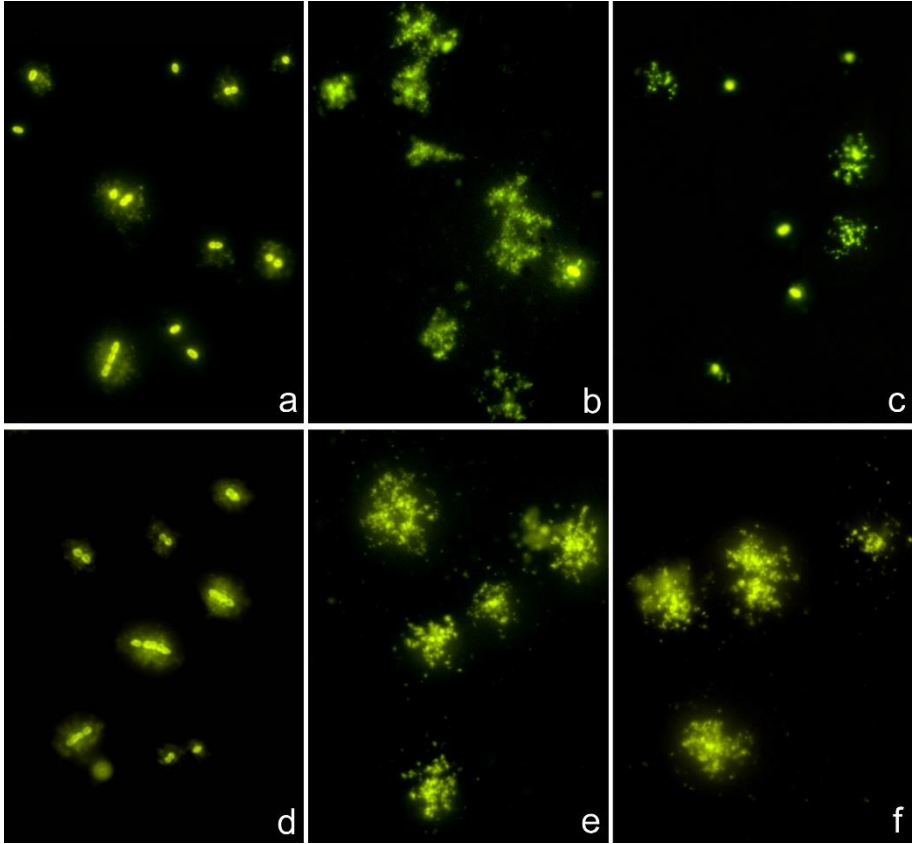


Figura 27. *Streptococcus pneumoniae* procesado para evaluar lisis celular por liberación del nucleoide, utilizando en ensayo Micromax. Las imágenes superiores (**a-c**) muestran una cepa sensible a azitromicina (CMI 0,006 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y las imágenes inferiores (**d-f**) corresponden a una cepa resistente a azitromicina (CMI 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Una alícuota de cada cultivo se incubó con 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de azitromicina (**a, d**), con 0,05% Tritón X-100, 2 mg/ml de lisozima, 25 mM de EDTA (**b, e**), y con azitromicina seguida de TLE (**c, f**). TLE y la posterior incubación con la solución de lisis dan lugar a la lisis celular y la consiguiente liberación del nucleoide en el 84,2% y 93,0% de las células en las cepas sensible y resistente, respectivamente (**b, e**). La incubación previa con azitromicina disminuye notablemente la frecuencia de células lisadas (40,3%) en la cepa sensible a azitromicina (**c**), pero solo disminuye las células lisadas al 86,2% en la cepa resistente (**f**).

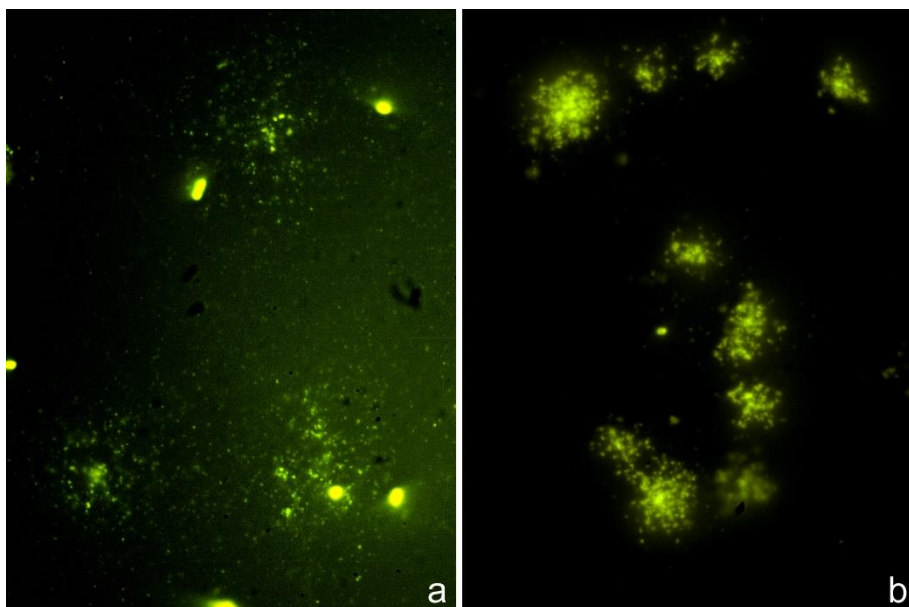


Figura 28. *S. pneumoniae* incubado con 0,05% Tritón X-100 y 2 mg/ml de lisozima, para inducir la respuesta autolítica, y procesado siguiendo el protocolo del ensayo Micromax®. **(a)** El ADN liberado aparece totalmente fragmentado y no es posible distinguir los nucleoides. **(b)** La incorporación de 25 mM EDTA a la solución suprime la fragmentación del ADN, permitiendo la identificación de los nucleoides.

Los resultados obtenidos tras procesar a ciegas los aislados clínicos se resumen en la tabla 2. El análisis ROC demuestra que una reducción de células lisadas $\geq 35,6\%$ tras la incubación con $0,5 \mu\text{g/ml}$ de eritromicina, y $\geq 40,4\%$ después de incubar con $4 \mu\text{g/ml}$ de doxiciclina, discrimina con exactitud cepas sensibles de no sensibles de *E. faecalis*. Los falsos negativos de resistencia son los más relevantes clínicamente. Hubo sólo una cepa de *E. faecalis* identificada falsamente como resistente (falso positivo de resistencia) a eritromicina, con CMI $1 \mu\text{g/ml}$, y dos para doxiciclina, ambas con CMI $8 \mu\text{g/ml}$, todas cerca del punto de corte de sensibilidad. Para *S. pneumoniae*, una reducción de células lisadas $\geq 20\%$ después de la incubación con el

punto de corte de sensibilidad de azitromicina, eritromicina y doxiciclina, distingue con precisión cepas sensibles de no sensibles. Sólo se encontró un falso negativo de resistencia para eritromicina. Los valores de sensibilidad y especificidad se encuentran en el rango entre 91,7% y 100%.

Tabla 2. Datos de aislados clínicos de *E. faecalis* y *S. pneumoniae*. Se indujo respuesta lítica en cepas sensibles (S) y no sensibles (NS), clasificadas según los antibiogramas estándar y los criterios del CLSI. El porcentaje de reducción de células lisadas por la incubación previa con el antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas fue muy significativo en las cepas sensibles, contrariamente a las cepas no sensibles.

<i>E. faecalis</i> (n=82)	Clasificación CLSI		Células lisadas por lisozima (%) $\bar{X} \pm \sigma$ (Me)	Reducción de células lisadas por el antibiótico (%) $\bar{X} \pm \sigma$ (Me)		Reducción discriminativa del porcentaje de células lisadas	Sensibilidad (%) IC 95%	Especificidad (%) IC 95%	AUC IC 95%; $p < 0,0001$
	S	NS		S	NS				
	Eritromicina (0,5 µg/ml)	25	57	83,0 ± 8,8 (83,5)	59,4 ± 20,4 (64,5)	21,1 ± 10,0 (22,6)	≥35,6	98,3 (94,0 - 100)	92,0 (79,4 - 100)
Doxiciclina (4 µg/ml)	49	33		67,9 ± 21,7 (68,3)	28,4 ± 11,2 (30,8)	≥40,4	93,9 (84,3 - 100)	95,9 (89,4 - 100)	0,95 (0,89 - 1,00)

<i>S. pneumoniae</i> (n=51)	Clasificación CLSI		Células lisadas por TLE (%) $\bar{X} \pm \sigma$ (Me)	Reducción de células lisadas por el antibiótico (%) $\bar{X} \pm \sigma$ (Me)		Reducción discriminativa del porcentaje de células lisadas	Sensibilidad (%) IC 95%	Especificidad (%) IC 95%	AUC IC 95%; $p < 0,0001$
	S	NS		S	NS				
	Azitromicina (0,5 µg/ml)	18	33		40,4 ± 14,6 (40,0)	6,6 ± 6,2 (4,5)		100 (98,5 - 100)	100 (97,2 - 100)
Eritromicina (0,25 µg/ml)	32	19	90,8 ± 6,0 (92,0)	48,6 ± 21,1 (46,5)	6,9 ± 8,0 (5,0)	≥20	94,7 (82,1 - 100)	93,8 (83,8 - 100)	0,94 (0,87 - 1,00)
Doxiciclina (0,25 µg/ml)	36	15		53,6 ± 22,8 (55,8)	4,3 ± 4,9 (3,5)		100 (96,7 - 100)	91,7 (81,3 - 100)	0,99 (0,97 - 1,00)

4. Discusión

Tomasz y Waks han publicado previamente que las altas dosis de cloranfenicol interfieren con la actividad autolítica de LytA en *S. pneumoniae* (132), pero en nuestro conocimiento, no hay ninguna información sobre el descenso del efecto lítico de la lisozima por inhibidores de la síntesis de proteínas en *E. faecalis*. Nuestro trabajo respalda que la síntesis de proteínas regula la respuesta autolítica de estas bacterias, a corto plazo. No obstante, el potencial uso diagnóstico de este efecto nunca se había estudiado y estandarizado para discriminar cepas resistentes a distintos tipos de antibióticos inhibidores de la síntesis ribosomal de proteínas. La eritromicina y la azitromicina son macrólidos, que se unen al dominio V del ARNr 23S de la subunidad ribosómica 50S causando la terminación prematura y disociación del peptidil-ARNt (532). La doxiciclina se une a la subunidad ribosomal 30S, bloqueando la entrada de aminoacil-transfer-ARN(t)s (533). De esta manera, diferentes mecanismos de inhibición de la síntesis de proteínas, dan lugar a un mismo efecto, es decir, a una disminución de la respuesta autolítica a la lisozima o al tratamiento TLE. De manera importante, otros inhibidores de la síntesis de proteínas pueden causar una respuesta similar. De hecho, encontramos que linezolid a 2 µg/ml (punto de corte de sensibilidad del CLSI) previene la respuesta lítica en todas las cepas de *S. pneumoniae* (no se muestran los datos). No se observó resistencia al antibiótico por parte de las bacterias analizadas. Con respecto a *E. faecalis*, se encontraron 14 aislados extra (14,6% del total de las 96 cepas analizadas) donde la lisozima no fue efectiva para

inducir lisis. Esto podría ser debido a modificaciones en la pared celular; por ejemplo, el incremento de los niveles de peptidoglicano O-acetilado (534). La totalidad de estos 14 aislados de *E. faecalis* son no sensibles a eritromicina y doxiciclina. Aunque el número de cepas es limitado, la carencia de lisis de la pared celular sugiere no susceptibilidad a los antibióticos aquí estudiados, complementando así los resultados del ensayo.

Nuestro estudio es una evidencia de que la respuesta lítica se puede emplear para una detección rápida de cepas resistentes a antibióticos que actúan sobre el ribosoma. Si la síntesis de proteínas es inhibida por el antibiótico, esto ocurre en cepas sensibles, el efecto lítico se ve muy disminuido. Sin embargo, si la síntesis de proteínas no se inhibe satisfactoriamente, esto es, en cepas resistentes al antibiótico, la lisis de la pared celular no se suprime o lo hace en menor medida. Las cepas resistentes se determinaron en 1,5-2 h. El análisis se puede automatizar usando un microscopio motorizado acoplado a un sistema de captura y análisis digital de imagen. Se debe tener en cuenta que la lisozima y los reactivos TLE se optimizaron para nuestro ensayo donde se requiere incubar posteriormente con una solución de lisis, para conseguir liberar los nucleoides adecuadamente. No está claro cómo actuarían los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas bajo otras condiciones de lisis. El proceso no requiere conocimiento previo del mecanismo de resistencia, a diferencia de la reacción en cadena de la polimerasa y los ensayos basados en microarrays. Podría ser de ayuda en infecciones críticas donde la determinación rápida de resistencia a antibióticos puede mejorar el resultado del paciente, también preservar el uso de antibióticos de

última opción, así como optimizar su uso médico y ayudar a prevenir la diseminación de resistencias a antibióticos.

Capítulo VI

**Detección rápida y sencilla de
resistencia a antibióticos
inhibidores de la síntesis de
proteínas en patógenos
Gram-negativos mediante la
evaluación del alargamiento celular
inducido por mitomicina C.**

Resumen:

El incremento de la resistencia de patógenos Gram-negativos a antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas es de gran preocupación. En situaciones que constituyen una amenaza para la vida, una detección temprana de la resistencia a antibióticos puede mejorar los resultados del paciente. Se diseñó y evaluó en cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y las enterobacterias, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, un ensayo rápido para la identificación de resistencia antibiótica a gentamicina, tobramicina y tigeciclina. Se incubaron cultivos en crecimiento exponencial con 0,5 µg/ml de mitomicina C (MMC) durante 2 h (10 µg/ml para *A. baumannii*), que induce un alargamiento significativo que se puede visualizar bajo el microscopio. La adición de la dosis apropiada del antibiótico 15 min antes de la incorporación de la MMC previene el alargamiento cuando la cepa es sensible al antibiótico, inhibiendo así la síntesis de proteínas. El alargamiento celular no fue impedido en las cepas resistentes al antibiótico, donde la síntesis de proteínas no se inhibió satisfactoriamente. En comparación con el antibiograma estándar basado en dilución, la sensibilidad del ensayo fue del 100% y la especificidad se mantuvo dentro del rango entre 96% y 100%. Los resultados se obtuvieron tras 2 h 45 min, partiendo de cultivos en crecimiento exponencial. El método es fácil, fiable y demuestra la idoneidad de la evaluación de cambios morfológicos simples, que son dependientes de la síntesis de proteínas, para la detección rápida de resistencia antibiótica.

1. Introducción

Los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas ribosomales bacterianas se prescriben habitualmente para tratar infecciones por patógenos Gram-negativos. En concreto, los aminoglucósidos se han utilizado tradicionalmente como agentes antibacterianos contra Gram-negativos (535). Las tetraciclinas y la familia de la glicilciclinas se administran también de manera habitual en infecciones por Gram-negativos, aunque muestran un espectro mucho más amplio que los aminoglucósidos (214). Dentro de las bacterias Gram-negativas, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y las *Enterobacteriaceae* *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* destacan como microorganismos que constituyen una amenaza para la vida. Estos patógenos son adquiridos con frecuencia en el hospital, principalmente en las unidades de cuidados intensivos, y pueden producir neumonía severa asociada a ventilación mecánica, infecciones del torrente sanguíneo vinculadas al catéter venoso central e infecciones del tracto urinario asociadas a catéter (24).

Las cepas de estos patógenos Gram-negativos resistentes a la mayoría de los antibióticos, incluyendo aminoglucósidos y tetraciclinas, están aumentando, incrementando así la alarma a nivel mundial (536). Las resistencias a la tigeciclina, relativamente reciente, son menos comunes por el momento (537-539). La adquisición de resistencia puede ser resultado de modificaciones químicas del antibiótico, expulsión de la célula, disminución de la unión debido a alteración de la diana o a la protección de los ribosomas (209). En las infecciones que significan un serio peligro para la vida, la

identificación de bacterias resistentes tan pronto como sea posible, puede prevenir fallos en el tratamiento y mejorar significativamente los resultados del paciente. En algunos casos, se ha demostrado que, después de una optimización cuidadosa, una evaluación de cambios morfológicos simples de bacterias es adecuada como un indicador rápido de resistencia (540).

La mitomicina C (MMC) es un agente bifuncional alquilante que principalmente induce enlaces cruzados entre las dos cadenas de ADN, siendo específico para una guanina en la secuencia 5'-CpG-3' en el surco menor del ADN (541, 542). Este estrés genotóxico desencadena una fuerte activación de la respuesta SOS en las bacterias, un mecanismo amplio y complejo para abordar el daño en el ADN (543). La respuesta SOS depende de la inducción de la expresión de genes que están principalmente involucrados en las distintas vías de reparación del ADN, tales como, la recombinación homóloga, la reparación por escisión de bases y la síntesis traslesión (544). La respuesta se desencadena mediante la generación de ADN de cadena sencilla, que recluta la proteína RecA. Los nucleofilamentos de RecA catalizan la auto-proteólisis del represor LexA, conduciendo a la desrepresión de los genes SOS.

Una de las consecuencias fenotípicas características de la respuesta SOS inducida por MMC es el alargamiento celular. La proteína inducible por SOS, Sula (o SfiA) inhibe la proteína FtsZ, que es necesaria para constituir el anillo Z contráctil en el sitio del futuro septo, y la subsiguiente división bacteriana (545-547). La prevención de la citocinesis permitiría la reparación del ADN antes de que la célula se divida. La respuesta SOS inducida por MMC también puede inhibir

la división celular por un mecanismo dependiente de LexA pero independiente de SulA, cuando la vía dependiente de Sfi está inoperativa (548).

En general, la respuesta de elongación inducida por MMC relacionada con SOS requiere una activación transcripcional a corto plazo y la consiguiente traducción ribosomal. De este modo, la inhibición de la síntesis de proteínas prevendría alguno de los resultados de la inducción de la respuesta SOS. En este estudio, valoramos la capacidad de la evaluación del alargamiento celular ligado a la respuesta SOS inducida por MMC, como un indicador rápido y simple de sensibilidad o resistencia a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, gentamicina, tobramicina, y tigeciclina, en infecciones por patógenos Gram-negativos altamente relevantes.

2. Material y métodos

2.1. Cepas bacterianas y determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se recogieron aislados clínicos de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en el Hospital Universitario de A Coruña entre los años 2001 y 2015. Se estudiaron en torno a 100 cepas por especie para cada uno de los siguientes antibióticos: gentamicina, tobramicina y tigeciclina. La tigeciclina no se evaluó en *P. aeruginosa* debido a su resistencia intrínseca. Este antibiótico en *E. coli*, se estudió solo en 22 aislados, ya que no se encontraron cepas resistentes al mismo. Las CMI's se determinaron mediante microdilución automatizada (MicroScan Walkaway, Siemens) y fueron corroboradas

por Etest (AB Biodisk, Biomerieux) siguiendo las instrucciones del fabricante, con la sensibilidad definida por los criterios del (CLSI) (478).

2.2. Inducción de la elongación celular

Se inocularon 2 ml de medio de cultivo líquido Mueller-Hinton con bacterias cultivadas en placas en medio sólido, y se incubaron a 37 °C durante 90 min. Luego, se diluyeron a una DO_{600} de 0,1 en medio Mueller-Hinton y se incubaron a 37 °C en tubos de 200 μ l con MMC durante 120 min en un volumen final de 30 μ l. Para establecer la concentración mínima de MMC que posiblemente induce el alargamiento celular sin pérdida significativa de células, se incubaron dos cepas de cada una de las especies con 11 dosis crecientes en un rango de 0 a 200 μ g/ml para *E. coli*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii* y de 0 a 50 μ g/ml para *P. aeruginosa*. Para evaluar la longitud celular, se utilizó un protocolo descrito previamente. A modo de resumen, después de la incubación con MMC, las bacterias se diluyeron a una concentración de 1×10^7 microorganismos/ml en medio líquido Mueller-Hinton, se incluyeron en un fino microgel de agarosa sobre un portaobjetos, se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, se dejaron secar, se tiñeron con el fluorocromo SYBR Gold, y se examinaron bajo microscopía de fluorescencia. El protocolo antes mencionado da lugar a imágenes nítidas y sin fondo que genere confusión, permitiendo una evaluación fiable de la longitud celular.

2.3. Determinación de resistencias mediante la elongación celular

El antibiótico se añadió al cultivo 15 min antes de la incorporación del tratamiento de MMC y se mantuvo en incubación durante 2 h más. Tras la incubación, las bacterias se procesaron para evaluar la longitud celular, como se describió anteriormente. Se procesaron siempre de manera simultánea cultivos control: sin antibiótico ni MMC, con solo antibiótico y solo con MMC. Los controles sin antibiótico ni MMC y con solo antibiótico proporcionaron la longitud celular basal de cada cepa específica. El cultivo con MMC estableció el tamaño del alargamiento. El cultivo con el antibiótico co-incubado con MMC revela si hay o no prevención del alargamiento celular inducido por MMC.

Se estableció empíricamente la relación entre la prevención del alargamiento celular inducido por MMC y la concentración de los puntos de corte del CLSI de los antibióticos; para ello se procesó un subgrupo de cepas comprendiendo un amplio rango de CMIs, incluyendo cepas sensibles, intermedias y resistentes, expuestas a dosis crecientes del antibiótico. Las concentraciones de los puntos de corte del CLSI de tigeciclina no están establecidas para *A. baumannii*, por lo que en clínica se utilizan los mismos puntos de corte que para *Enterobacteriaceae*. Se utilizaron varias cepas con CMIs próximas a los puntos de corte de sensibilidad y resistencia. Se determinaron las concentraciones de antibióticos que suprimen el alargamiento celular inducido por la MMC en las cepas sensibles, pero no en las cepas resistentes e intermedias. Se consideró que se suprime el alargamiento

inducido por la MMC cuando el tamaño bacteriano no es significativamente diferente del control sin tratamiento.

La concentración de los antibióticos se optimizó de tal manera que una cepa clasificada como sensible siguiendo los criterios del CLSI debe mostrar abolición del alargamiento celular después de ser incubada con la concentración más baja de antibiótico, establecida como dosis de corte de sensibilidad cuando se usa el parámetro de supresión del alargamiento. Una cepa no-sensible no debería manifestar eliminación de la elongación inducida por MMC con ninguna de las concentraciones de antibiótico de las dosis de corte establecidas.

Una vez implementadas las concentraciones de los puntos de corte para el criterio de supresión de la elongación que correlacionan con los puntos de corte de sensibilidad del CLSI para cada antibiótico y bacteria, se procesaron a ciegas los aislados clínicos recogidos. Para cada uno, se establecieron cuatro cultivos, como se indicó anteriormente: (1) un cultivo control sin antibiótico ni MMC, (2) un cultivo control con la dosis del antibiótico establecida como punto de corte, (3) un cultivo con tan solo MMC, y (4) un cultivo con el antibiótico y MMC.

2.4. Análisis de datos

Las imágenes se capturaron con una cámara Apogee KX32 ME, y el análisis de imagen fue llevado a cabo utilizando el software Visilog 5.1 (Noesis, Gifsur Yvette, Francia), midiendo 100 células por ensayo. Los datos fueron analizados mediante SPSS Statistics 21 para Windows

(IBM). Para la comparación entre grupos se utilizó el test *t*. La significación estadística se definió como $p < 0,05$.

Las curvas ROC se construyeron con los resultados obtenidos durante el ensayo de validación. Los valores del área bajo la curva indican la habilidad global de clasificación del test. Los índices de validación se estimaron usando el paquete de software Epidat 3.1 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España y Panamerican Health Organization, Washington, DC).

3. Resultados

3.1. Elongación bacteriana inducida por MMC

Se expusieron cultivos en crecimiento exponencial a concentraciones crecientes de MMC durante 120 min (figura 29). El tamaño de las células bacterianas fue heterogéneo en todas las dosis. La medida de la longitud celular en *E. coli* y *K. pneumoniae* evidenció un aumento progresivo en la longitud media hasta 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$ seguido de un decrecimiento progresivo. La concentración celular fue disminuyendo progresivamente desde 1 $\mu\text{g/ml}$ en ambas especies. De esta manera se seleccionó la concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de MMC para los siguientes experimentos con antibióticos, ya que es la dosis mínima que proporciona el mayor alargamiento, aumentando la longitud media respecto al basal entre tres y cuatro veces en ambas especies, manteniendo a su vez el número de células.

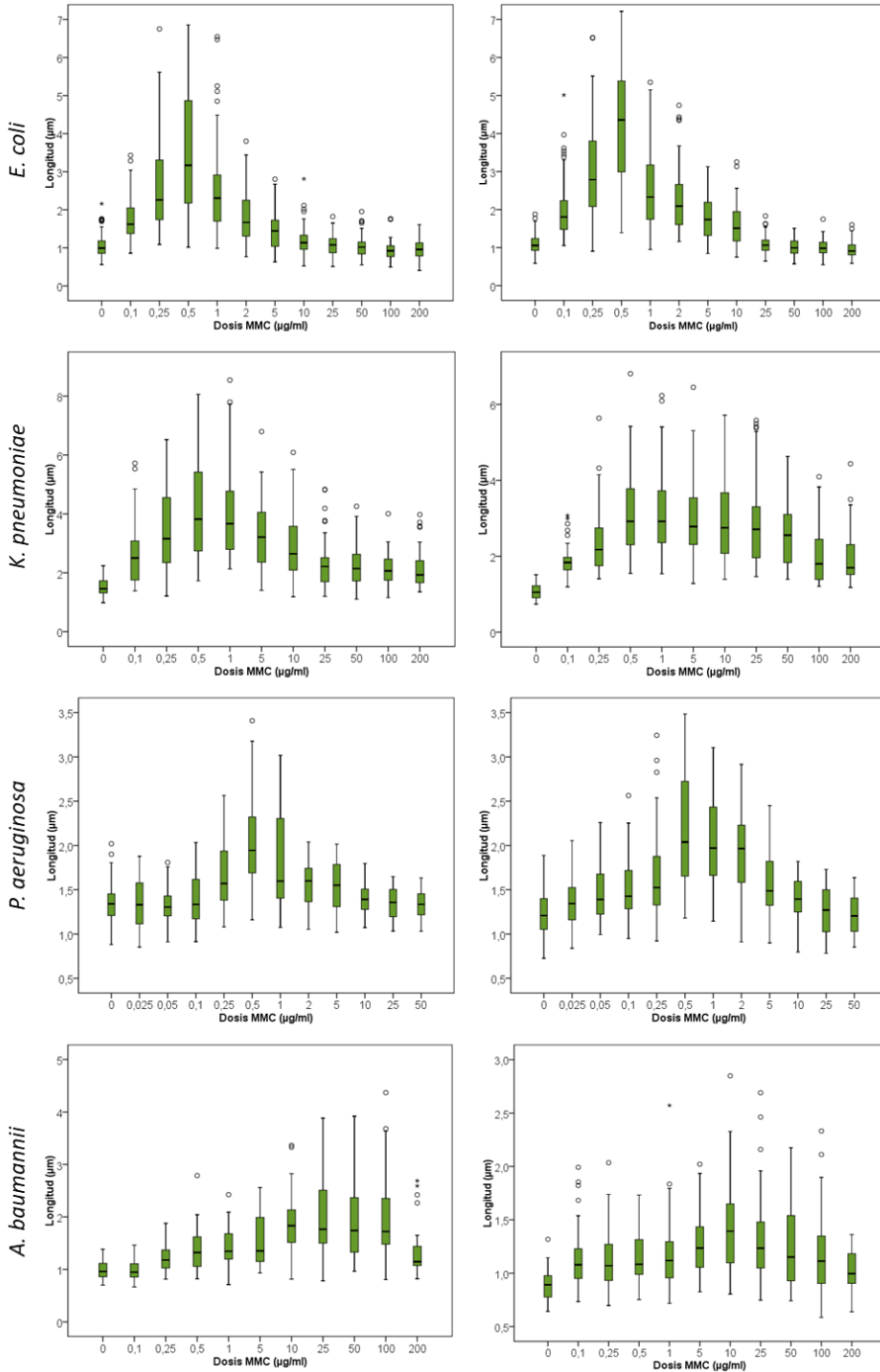


Figura 29. Dosis-respuesta del alargamiento celular inducido por MMC en dos cepas de *Escherichia coli* (primera línea), *Klebsiella pneumoniae* (segunda línea), *Pseudomonas aeruginosa* (tercera línea) y *Acinetobacter baumannii* (última línea). Las dosis de MMC se expresan en $\mu\text{g/ml}$ (eje horizontal). La longitud celular bacteriana está en μm (eje vertical). Los datos se muestran en un diagrama de cajas y bigotes. La línea horizontal de la caja corresponde con la mediana, la línea inferior de la caja es el primer cuartil, la línea superior de la caja es el tercer cuartil y los bigotes (el final de las líneas verticales) son los datos con valores máximos y mínimos. Los puntos fuera de las cajas representan los valores atípicos.

3.2. Determinación de resistencias empleando la elongación celular

La base del proceso para discriminar cepas sensibles de no-sensibles se ilustra en la figura 30. Dos cepas de *E. coli*, una sensible a gentamicina (S, CMI: $1 \mu\text{g/ml}$) y otra resistente a la misma (R, CMI: $32 \mu\text{g/ml}$) se incubaron con: $4 \mu\text{g/ml}$ de gentamicina (punto de corte de sensibilidad del CLSI) 135 min, $0,5 \text{ mg/l}$ de MMC 120 min, y 135 min con gentamicina junto con MMC durante los últimos 120 min. La gentamicina sola no modificó la longitud celular basal (basal-S: $1,10 \pm 0,25 \mu\text{m}$; basal-R: $1,16 \pm 0,23 \mu\text{m}$; gentamicina-S: $1,12 \pm 0,18 \mu\text{m}$; gentamicina-R: $1,23 \pm 0,22 \mu\text{m}$; media \pm ds). El tratamiento con MMC indujo un alargamiento celular significativo (MMC-S: $4,21 \pm 1,41 \mu\text{m}$; MMC-R: $3,98 \pm 1,21 \mu\text{m}$). La incubación con gentamicina seguida de MMC suprimió el alargamiento celular en la cepa sensible (gentamicina+MMC-S: $1,13 \pm 0,21 \mu\text{m}$), pero no previno el alargamiento en la cepa resistente (gentamicina+MMC-R: $4,02 \pm 1,23 \mu\text{m}$).

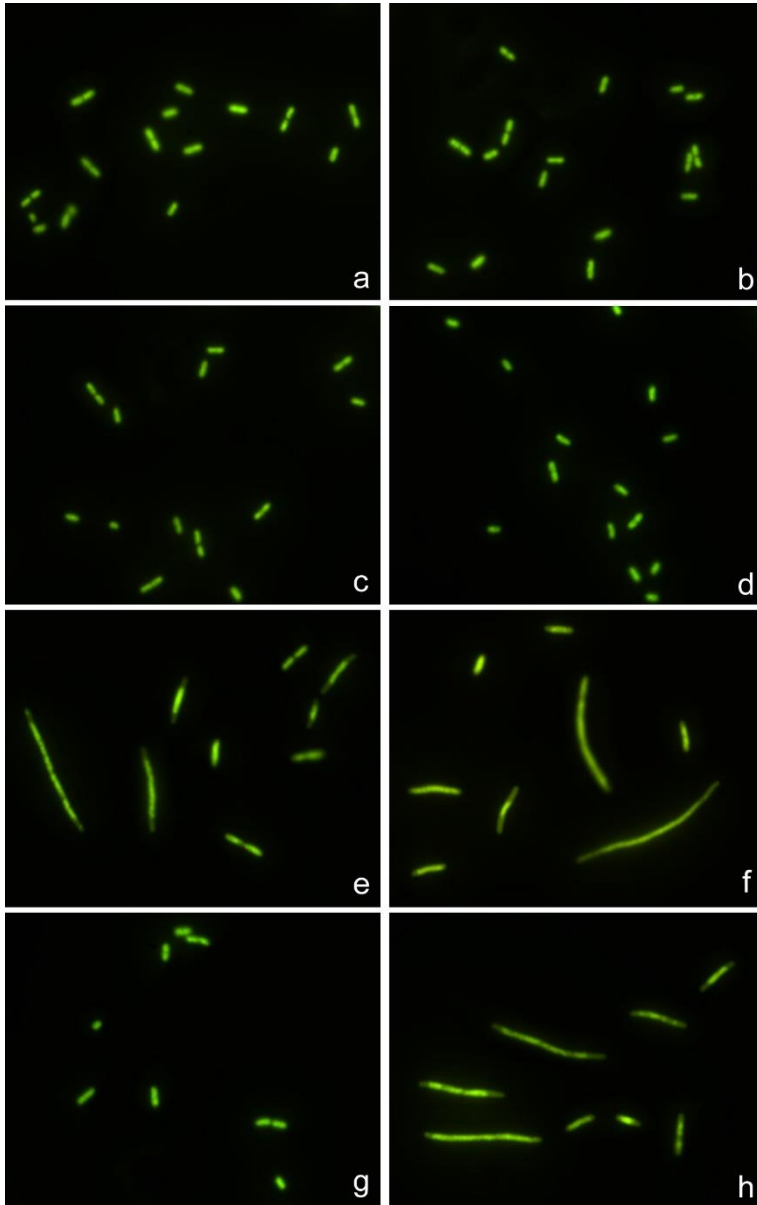


Figura 30. Cepas de *E. coli* sensible (izquierda, CMI: 1 µg/ml) y resistente (derecha; CMI: 32 µg/ml) a gentamicina. (a, b) Control sin antibiótico. (c, d) Incubadas con gentamicina 4 µg/ml. (e, f) Tratadas con MMC 0,5 µg/ml. (g, h) Incubadas con gentamicina y MMC. La MMC induce alargamiento celular (e, f). La gentamicina previene el alargamiento celular inducido por MMC en la cepa sensible (g) pero no en la cepa resistente (h).

La figura 31 muestra una dosis respuesta de la supresión del alargamiento celular inducido por MMC empleando concentraciones crecientes de gentamicina, en un rango de 0,25 a 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en cuatro cepas de *E. coli* con CMI's crecientes (1, 4, 8, y 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Según los criterios del CLSI, la primera cepa es sensible; la segunda está en el punto de corte de sensibilidad; la tercera tiene resistencia intermedia; y la última se clasifica como resistente. No se apreciaron diferencias en la longitud celular entre las distintas concentraciones de gentamicina en los cultivos bacterianos que fueron incubados solo con el antibiótico. Por ello, para mayor claridad, se muestra el resultado de una única dosis de gentamicina.

En *E. coli*, tras aplicar una dosis de gentamicina de 0,5XCMI se evidenció de manera general una clara supresión parcial del alargamiento celular inducido por MMC. Esta supresión fue absoluta, es decir, no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la longitud del control, cuando la concentración de gentamicina era similar a la CMI en cepas sensibles y 2XCMI en el resto de las cepas. Aparentemente la dosis de gentamicina que puede discriminar cepas sensibles de no-sensibles basándose en el criterio de prevención del alargamiento celular inducido por MMC podría ser similar al punto de corte de sensibilidad indicado por el CLSI, basado en el criterio de inhibición del crecimiento celular (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Se incubaron también con las mismas dosis de gentamicina cuatro cepas de *P. aeruginosa* (CMI's: 1, 4, 6, y 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (figura 31). Siguiendo los criterios del CLSI, la primera cepa es sensible; la segunda está en el punto de corte de sensibilidad; la tercera es intermedia; y la última es resistente. *P. aeruginosa* mostró una sensibilidad más alta a la

gentamicina para la prevención del alargamiento inducido por MMC. La supresión total del alargamiento fue conseguida por concentraciones del antibiótico cercanas a 0,5XCMI. Las dosis de gentamicina empleadas nunca modificaron el alargamiento inducido por MMC en la cepa resistente. Utilizando una concentración similar a la CMI se podría estar asignando incorrectamente algunas cepas no-sensibles como sensibles, atendiendo a los criterios del CLSI. Como consecuencia de estos resultados, la concentración del punto de corte que diferencia cepas sensibles de no-sensibles por medio del criterio de prevención del alargamiento celular inducido por MMC, se estimaría en 2 µg/ml, la cual correlacionaría con el punto de corte del CLSI de 4 µg/ml basado en la inhibición del crecimiento celular.

Tras varios ensayos de dosis-respuesta similares a los expuestos, se establecieron para el método basado en la supresión del alargamiento inducido por MMC, las concentraciones de los puntos de corte de gentamicina, tobramicina y tigeciclina, que discriminan cepas sensibles de no-sensibles según la guía del CLSI. Estas dosis fueron similares o inferiores a los correspondientes puntos de corte de sensibilidad de CLSI, excepto para tobramicina en *E. coli* y *P. aeruginosa*, que requirieron la utilización de una dosis correspondiente al doble del punto de corte del CLSI (tabla 3).

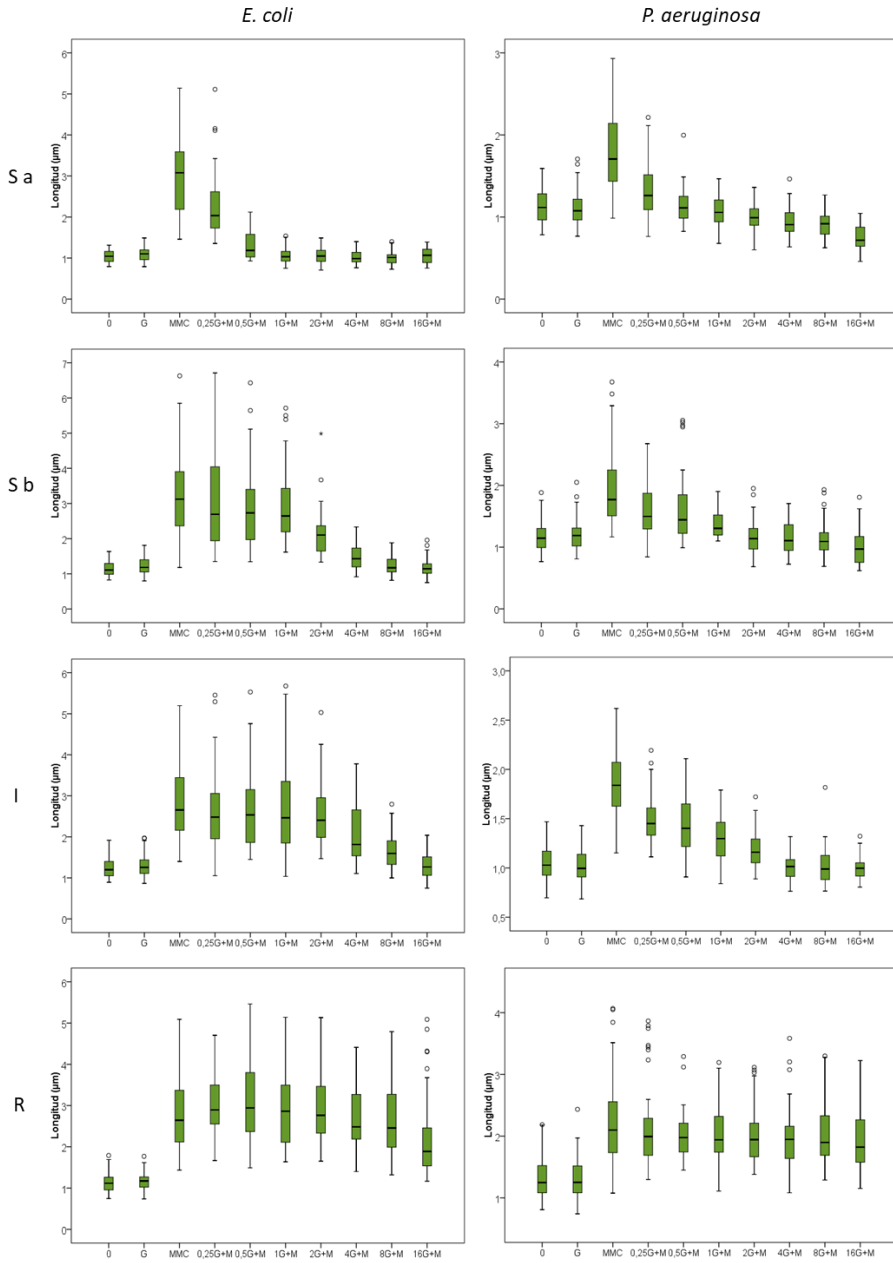


Figura 31. Medida de la longitud celular (μm) en cepas de *E. coli* (izquierda) y *P. aeruginosa* (derecha) con diferentes CMI para gentamicina. La primera fila se corresponde con las cepas sensibles (Sa), ambas con CMI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; la segunda fila muestra cepas en el límite de sensibilidad (Sb), ambas con CMI 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; la tercera fila se corresponde con cepas intermedias (I), con CMI 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para *E. coli* y 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para *P. aeruginosa*; y la última fila corresponde a las cepas resistentes (R), con CMI 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Cada cepa muestra la longitud celular (eje vertical) medida en μm , de izquierda a derecha (eje horizontal), cultivos control (C), cultivos incubados con gentamicina (G), 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MMC, y con dosis crecientes de gentamicina (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; y 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) junto con 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MMC (G+M). Los cultivos incubados con las distintas concentraciones de gentamicina sola, no muestran diferencias significativas en la longitud celular, así que, con la intención de clarificar, solo se ha incluido una (G). Los datos se representan en diagramas de cajas y bigotes. La línea horizontal de la caja indica la mediana, la línea más baja de la caja es el primer cuartil, la línea superior de la caja es el tercer cuartil, y los bigotes (la terminación de las líneas verticales) son los valores máximo y mínimo. Los valores atípicos se representan como puntos fuera de la caja.

3.3. Ensayo de validación

La tabla 3 resume los resultados obtenidos tras procesar a ciegas los aislados clínicos y comparar los datos con los antibiogramas estándar. La tigeciclina no se evaluó en *P. aeruginosa* dado que esta especie posee resistencia intrínseca. Debido a la falta de cepas resistentes a tigeciclina, sólo se estudiaron 22 aislados en *E. coli*, donde todos fueron correctamente identificados como sensibles. La AUC en el análisis ROC mostró una discriminación prácticamente absoluta de las cepas no-sensibles utilizando las concentraciones de antibiótico identificadas como dosis de corte. La sensibilidad fue del 100% y la especificidad entre el 96% y el 100%. Sólo se encontró una cepa falso positivo de no-sensibilidad para tobramicina y otra para tigeciclina en

K. pneumoniae. *P. aeruginosa* también reveló un falso positivo para gentamicina y tobramicina. En *A. baumannii* se encontraron dos falsos positivos para gentamicina y para tobramicina. Los falsos positivos de resistencia no son de por sí muy relevantes y todos poseen CMI's próximas a la concentración del punto de corte de sensibilidad. Los falsos negativos de resistencia son más peligrosos, pero sólo se detectó uno para tigeciclina en *A. baumannii*, con una CMI de 2 µg/ml, es decir, en el punto de corte de *Enterobacteraceae*.

Tabla 3. Estudio de validez analítica para el ensayo de la prevención del alargamiento celular inducido por mitomicina C para la detección de resistencia a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, en comparación con los antibiogramas estándar y los criterios del CLSI, en aislados clínicos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

	Antibiótico	Clasificación CLSI		Dosis (µg/ml)	Sensibilidad (%) IC 95%	Especificidad (%) IC 95%	AUC IC 95%; <i>p</i> <0,0001
		S	NS				
<i>E. coli</i>	Gentamicina (n = 98)	25	73	4	100 (98,0 - 100)	100 (99,3 - 100)	1 (1,00 - 1,00)
	Tobramicina (n = 101)	67	34	8	100 (98,5 - 100)	100 (99,3 - 100)	1 (1,00 - 1,00)
	Tigeciclina (n = 22)	22	0	1	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	Gentamicina (n = 104)	70	34	4	100 (98,5 - 100)	100 (99,3 - 100)	1 (1,00 - 1,00)
	Tobramicina (n = 100)	56	44	4	100 (98,9 - 100)	98,2 (93,9 - 100)	0,99 (0,97 - 1,00)
	Tigeciclina (n = 101)	82	19	0,25	100 (97,4 - 100)	98,8 (95,8 - 100)	0,99 (0,98 - 1,00)
<i>P. aeruginosa</i>	Gentamicina (n = 101)	72	29	2	100 (98,3 - 100)	98,6 (95,2 - 100)	0,99 (0,98 - 1,00)
	Tobramicina (n = 102)	76	26	8	100 (98,1 - 100)	98,7 (95,5 - 100)	0,99 (0,98 - 1,00)
<i>A. baumannii</i>	Gentamicina (n = 107)	44	63	1	100 (99,2 - 100)	95,5 (88,2 - 100)	0,98 (0,94 - 1,00)
	Tobramicina (n = 115)	50	65	4	100 (99,2 - 100)	96 (89,6 - 100)	0,98 (0,95 - 1,00)
	Tigeciclina (n = 107)	75	32	0,09	96,9 (89,3 - 100)	100 (99,3 - 100)	0,98 (0,94 - 1,00)

4. Discusión

En un trabajo previo, demostramos que la respuesta lítica inducida por una breve incubación con lisozima en *Enterococcus faecalis* o una mezcla de Tritón X-100, lisozima y EDTA en *Streptococcus*

pneumoniae estaba regulada por la síntesis de proteínas (549). Cuando las bacterias se incuban previamente con un antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas, la respuesta lítica se suprime en gran medida en las cepas sensibles, donde se ha inhibido la síntesis de proteínas en los ribosomas. Sin embargo, la respuesta lítica se anuló en menor medida en las cepas resistentes, donde no ha sido efectiva la inhibición de la síntesis de proteínas por el antibiótico. Se demostró que es un test eficiente para la detección rápida de resistencia a antibióticos que inhiben las síntesis de proteínas en ambos patógenos Gram-positivos.

En el presente estudio, se pretende establecer un método rápido para la determinación de resistencia a antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en patógenos Gram-negativos de relevancia clínica como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. La estrategia consistió en identificar una respuesta bacteriana que sea fácil de reconocer, influenciada por la síntesis de proteínas a corto plazo. De forma clásica, tras un tratamiento con MMC se observa alargamiento celular (550), consecuencia de la inducción de la respuesta SOS. De hecho, dada su eficacia, la MMC se utiliza habitualmente como control positivo en experimentos relacionados con respuesta SOS, incluyendo el efecto de alargamiento celular (551, 552).

En el caso específico de *A. baumannii*, aunque la proteína represora Lex A parece estar ausente, se induce una respuesta tipo SOS dependiente de *recA* como consecuencia del daño en el ADN (553). Quizá esta peculiaridad esté en parte relacionada con la necesidad de incubar *A. baumannii* con concentraciones de MMC más altas que las otras especies para lograr un alargamiento significativo. Curiosamente, un estudio reciente sugiere que el tratamiento con

MMC daría lugar a una gran masa de nucleóide sin segregar localizada en el centro de la célula, la cual podría bloquear la construcción del anillo Z en *E. coli*, y que este resultado podría ser independiente de la respuesta SOS (554). Aun así, este efecto se describió tras una concentración de 2 µg/ml de MMC, superior a los 0,5 µg/ml empleados en nuestro estudio.

En este trabajo demostramos que el efecto de elongación celular, una consecuencia del alargamiento bacteriano inducido por MMC, es dependiente de la síntesis de proteínas. La incubación con dosis de MMC demasiado altas evita el crecimiento celular en comparación con un cultivo sin este agente. Además, estas células que están expuestas a una concentración excesiva de MMC no pueden alargarse; así que, se debe establecer la dosis óptima de MMC que da lugar a un alargamiento celular significativo pero que también mantenga un número adecuado de células. Por consiguiente, se optimizó, para cada antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas, en cada especie bacteriana, un ensayo de supresión del alargamiento celular inducido por MMC. La inhibición efectiva de la síntesis de proteínas por el antibiótico previene la elongación celular inducida por MMC en las cepas sensibles. Dicho de otro modo, el antibiótico no suprime el alargamiento provocado por la MMC en las cepas resistentes, en las que la síntesis de proteínas no resulta inhibida por el antibiótico. Este estudio evidencia que la ausencia de prevención de la elongación celular inducida por MMC, permite una rápida identificación de cepas que son resistentes a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas en patógenos Gram-negativos.

La MMC es un agente muy útil para desencadenar la respuesta SOS, y no encontramos ningún aislado clínico que no se alargue tras el tratamiento con MMC. Es posible que ciertas cepas mutantes en la respuesta SOS inducida por MMC, impedida en distintos niveles de la misma, no puedan ser evaluadas utilizando este protocolo. Pese a ello, el objetivo principal del test es aplicarlo a cepas clínicas, y hasta donde sabemos, estos mutantes aparecen principalmente en cepas de laboratorio. Los mutantes espontáneos con una respuesta SOS de protección contra el estrés abolida, serían menos viables en un entorno natural cambiante y su virulencia podría verse afectada (543, 544). No es previsible una resistencia natural a la MMC, pero en tal caso, podrían evaluarse inductores de la respuesta SOS alternativos.

El ensayo se validó para los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas que se emplean de manera más frecuente para estas cepas Gram-negativas en nuestra área. Aunque todos los antibióticos ensayados en este estudio actúan sobre la subunidad ribosomal pequeña 30S, existen algunas diferencias. Gentamicina y trobamicina son aminoglucósidos, que se unen principalmente a nucleótidos específicos en la hélice H-44 o sitio A del ARNr 16S de la subunidad ribosomal pequeña 30S (555). Esta unión secuencia-específica causa un error de lectura de los codones del ARNm por parte del ARNt, así como una inhibición de la traslocación del peptidil-ARNt del sitio A al sitio P (556).

Los aminoglucósidos también pueden interactuar con la hélice 69 en el ARNr 23S de la subunidad ribosómica grande 50S, impidiendo la disociación y la nueva unión de las subunidades ribosómicas (557). Pueden existir particularidades dependiendo del tipo de

aminoglucósido, ya que su afinidad está relacionada con el número de puentes de hidrógeno que establecen con el ARN diana (558). La tigeciclina es una glicilciclina que también se une al ARNr 16S de la subunidad 30S de los ribosomas, pero bloquea la entrada del aminoacil-ARNt, deteniendo la elongación de la cadena peptídica (559). En general, independientemente del proceso, la síntesis de proteínas ribosómicas se ve comprometida por los diferentes antibióticos, lo que influye en la respuesta SOS y en el consiguiente alargamiento celular.

Este ensayo es bastante simple y fiable, obteniéndose los resultados en 2 h y 45 min cuando trabajamos con cultivos en crecimiento exponencial. Si no está en fase exponencial, el aislado se debe cultivar en medio líquido Mueller-Hinton durante 90 min. Este ensayo es exclusivamente morfo-funcional, por lo que no requiere el conocimiento previo del mecanismo, los genes, las mutaciones o las proteínas responsables de la resistencia, al contrario que en el caso del uso de la PCR, microarrays, o procesos basados en espectrometría de masas. El test rápido proporciona, con celeridad, información relevante sobre la sensibilidad o no al antibiótico. Este es la información práctica que los clínicos necesitan para prescribir, o no, o cambiar, o no, el antibiótico. Los niveles intermedios de resistencia se considerarían dentro de la categoría de no-sensibles, siendo más recomendable utilizar otros antibióticos, si es posible.

El ensayo se podría extender y optimizar a otros microorganismos con la capacidad de cambiar su morfología como resultado de la inducción de la respuesta SOS o similar a la misma. Además, la monitorización de la morfología celular puede ser

fácilmente automatizable ya que las medidas de longitud forman parte de muchas rutinas básicas de análisis de imagen o incluso mediante citometría de flujo o microfluídica, reduciendo el tiempo de trabajo. No es estrictamente necesario disponer de un software para medir la longitud celular. Bajo las condiciones técnicas óptimas previamente establecidas, los cambios en la longitud celular son muy llamativos y una inspección visual rápida y simple del portaobjetos, permite establecer claramente si hay o no una variación respecto a los controles. El análisis de imagen solo ayudaría a cuantificar la longitud con exactitud. Aunque la prueba se podría realizar en muestras biológicas directas incubando con un rango de dosis de los diferentes antibióticos, un ensayo riguroso requiere que los patógenos se aislen e identifiquen primero. Esto es debido a que la dosis del punto de corte óptima puede ser distinta para las diferentes especies y antibióticos, de modo similar a lo que ocurre en los antibiogramas estándar. Además, el procesamiento simultáneo de cepas control de referencia, susceptibles y resistentes, de la correspondiente especie bacteriana, conjuntamente con la muestra clínica, mejora la confianza del ensayo.

El ensayo de prevención de la elongación inducida por MMC tiene un potencial valor clínico, ya que la identificación rápida de cepas resistentes puede evitar fallos en los tratamientos y disminuir los costes de la atención sanitaria. Además, el ensayo del presente trabajo puede ayudar a prevenir la diseminación de patógenos resistentes peligrosos por mal uso de los antibióticos y contribuir a preservar los medicamentos antibacterianos de última opción.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en los diferentes trabajos que componen esta tesis, podemos obtener las siguientes conclusiones:

Detección rápida de sensibilidad/resistencia a quinolonas, antibióticos que inducen roturas en el ADN, en bacterias Gram-negativas.

1. Tras la incubación con la quinolona, las bacterias incluidas en un microgel sobre un portaobjetos son lisadas, liberando el nucleoide, el cual se visualiza con microscopía de fluorescencia. Cada bacteria individual de las cepas sensibles muestra un halo de difusión de fragmentos del nucleoide, mientras que este se mantiene intacto en las bacterias de cepas resistentes. Este ensayo de integridad del ADN (fragmentación o no del nucleoide) alcanza prácticamente el 100% de sensibilidad y especificidad, en 40 minutos.

Detección rápida de sensibilidad/resistencia a antibióticos que inhiben la síntesis del peptidoglicano.

2. Se puso a punto una modificación del ensayo de difusión del nucleoide descrito previamente, empleando una solución de lisis adaptada, que solo es efectiva si la pared bacteriana ha sido afectada por el antibiótico. Las bacterias de las cepas sensibles, con paredes debilitadas, serán afectadas por la solución de lisis y liberarán su nucleoide. En las cepas resistentes, las paredes se encontrarán inalteradas y las células no se lisarán; mantendrán su morfología. Se corresponde a un ensayo de integridad de la pared (liberación o no del nucleoide).

Diferenciación rápida de cepas sensibles y resistentes en A. baumannii a ciprofloxacino (fluoroquinolona) y a meropenem (β -lactámico carbapenémico).

3. El ensayo de integridad del ADN y el de integridad de la pared permiten la detección de cepas resistentes a ciprofloxacino y a meropenem respectivamente, con una sensibilidad y especificidad total o casi total, en 3 horas y 20 minutos.

Determinación rápida de resistencia a colistina en A. baumannii.

4. La colistina es un antibiótico de última opción que actúa sobre la membrana plasmática. A pesar de que sus dianas no son ni el ADN ni la pared, estos se dañan secundariamente, en una fracción de la población bacteriana.
5. Tras incubar con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de colistina, en el ensayo de integridad del ADN, un valor igual o inferior al 8,5% de células con el ADN fragmentado, identifica cepas resistentes con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90%. En el ensayo de integridad de la pared, un valor igual o inferior al 11% de células que liberan el nucleoide identifica cepas resistentes con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96%. Los resultados de ambos ensayos se obtienen en 3 horas y 30 minutos.

*Detección rápida de resistencia a ceftazidima (β -lactámico cefalosporina) en *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.*

6. La ceftazidima induce un aumento de la longitud celular en las cepas sensibles, lo cual no ocurre en las resistentes. La dosis de corte empleada para discriminar cepas sensibles, intermedias y resistentes, es inferior al punto de corte del CLSI, dado que la elongación es significativa a concentraciones del antibiótico subinhibitorias de proliferación. Dicha dosis es específica de cada patógeno.
7. La simple evaluación del parámetro morfológico -elongación celular- permite la determinación de resistencia a ceftazidima, en 1h 15 min, con sensibilidad 82,3%-100% y especificidad 97,2%-100%, dependiendo de la especie estudiada.

*Evaluación rápida de la resistencia a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas en bacterias Gram-positivas (*E. faecalis* y *S. pneumoniae*).*

8. La incubación de *E. faecalis* con 1 mg/ml de lisozima, 10 minutos a 37 °C, y de *S. pneumoniae* con 0,05% de Tritón-X-100, 2 mg/ml de lisozima y 25 mM de EDTA (TLE), 5 minutos a 37 °C, seguido de la inclusión en microgel e incubación con una solución de lisis desencadena una respuesta lítica en una fracción celular identificable mediante dispersión local de ADN. Dicha autólisis es una respuesta inmediata dependiente de la síntesis de proteínas, puesto que puede ser prevenida por

la acción de un antibiótico inhibidor de la síntesis proteica, reduciendo significativamente la proporción de células lisadas. En las cepas resistentes, la síntesis proteica no resulta afectada por lo que no se previene la respuesta lítica y la fracción de células lisadas apenas se modifica con respecto al control sin antibiótico.

9. La incubación, previa al tratamiento de inducción lítica, de *E. faecalis* durante 75 min con 0,5 µg/ml de eritromicina o 4 µg/ml de doxiciclina, permite discriminar cepas sensibles de resistentes, cuando la reducción del porcentaje de células lisadas es igual o superior al 35,6% para eritromicina y 40,4% para doxiciclina, con una sensibilidad del 98,3% y 93,9% y una especificidad de 92% y 95,9% respectivamente.
10. La incubación, previa al tratamiento de inducción de lisis, en *S. pneumoniae* durante 60 min con 0,5 µg/ml de azitromicina, 0,25 µg/ml de eritromicina o 0,25 µg/ml de doxiciclina, permite discriminar cepas sensibles de las resistentes, cuando la reducción del porcentaje de células lisadas es igual o superior al 20%, con una sensibilidad del 100%, 94,7% y 100% y una especificidad de 100%, 93,8% y 91,7% respectivamente.
11. La reducción de la respuesta lítica permite discriminar cepas sensibles y resistentes a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, en *E. faecalis* y *S. pneumoniae* en 1,5-2 horas.

Evaluación rápida de la resistencia a antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas en bacterias Gram-negativas (E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa y A. baumannii).

12. La incubación con MMC durante 120 minutos, provoca un alargamiento celular dosis- y especie-dependientes, en relación con la respuesta SOS tras el daño del ADN, en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Este efecto de elongación es dependiente de la síntesis de proteínas, ya que puede ser prevenido por la acción de un antibiótico inhibidor de la síntesis proteica. En las cepas resistentes, la no afectación de la síntesis de proteínas hace que apenas se pueda impedir el alargamiento inducido por la MMC.

13. La incubación previa a MMC, con 4 µg/ml de gentamicina u 8 µg/ml de tobramicina, permiten la identificación de cepas de *E. coli* resistentes a ambos antibióticos con una sensibilidad y especificidad del 100%.

14. La incubación con 4 µg/ml de gentamicina o tobramicina, o con 0,25 µg/ml de tigeciclina, previamente a MMC, posibilita la discriminación de cepas resistentes a estos antibióticos en *K. pneumoniae*, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100%, 98,2% y 98,8%, respectivamente.

15. La incubación de cepas de *P. aeruginosa* con 2 µg/ml de gentamicina u 8 µg/ml de tobramicina, previa a MMC, permite identificar cepas resistentes a ambos antibióticos con una

sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,6% y 98,7%, respectivamente.

16. El tratamiento previo a la incubación con MMC, con 1 µg/ml de gentamicina, 4 µg/ml de tobramicina o 0,09 µg/ml de tigeciclina, en *A. baumannii*, permite discernir cepas resistentes con una sensibilidad del 100% para gentamicina y tobramicina y del 96,9% en tigeciclina; y una especificidad de 95,5%, 96% y 100%, respectivamente.

17. El ensayo de prevención del alargamiento celular inducido por MMC permite obtener resultados en 2 horas y 45 minutos.

Bibliografía

1. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J Clin Cases*. 2014;2(12):787-814.
2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):538-82.
3. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol*. 1986;36(2):228-40.
4. Vijayakumar S, Biswas I, Veeraraghavan B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter spp.*: an update. *Future Sci OA*. 2019;5(6):FSO395.
5. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol*. 1992;30(10):2680-5.
6. Nemeč A, Krizová L, Maixnerová M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(Pt 3):934-42.
7. Cosgaya C, Marí-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, *et al.* *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(10):4105-11.
8. Thompson MG, Black CC, Pavlicek RL, Honnold CL, Wise MC, Alamneh YA, *et al.* Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1332-42.
9. Greene C, Wu J, Rickard AH, Xi C. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different

- biomedical relevant surfaces. *Lett Appl Microbiol.* 2016;63(4):233-9.
10. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol.* 1998;36(7):1938-41.
 11. Giannouli M, Antunes LCS, Marchetti V, Triassi M, Visca P, Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis.* 2013;13:282.
 12. Antunes LCS, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e22674.
 13. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(2):91-102.
 14. Scott NE, Kinsella RL, Edwards AVG, Larsen MR, Dutta S, Saba J, *et al.* Diversity within the O-linked protein glycosylation systems of *Acinetobacter* species. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(9):2354-70.
 15. Boll JM, Tucker AT, Klein DR, Beltran AM, Brodbelt JS, Davies BW, *et al.* Reinforcing Lipid A Acylation on the Cell Surface of *Acinetobacter baumannii* Promotes Cationic Antimicrobial Peptide Resistance and Desiccation Survival. *MBio.* 2015;6(3):e00478-00415.
 16. Antunes LCS, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis.* 2014;71(3):292-301.
 17. Abdi SN, Ghotaslou R, Ganbarov K, Mobed A, Tanomand A, Yousefi M, *et al.* *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. *Infect Drug Resist.* 2020;13:423-34.

18. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(12):939-51.
19. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(1):1-14.
20. Jaruratanasirikul S, Nitchot W, Wongpoowarak W, Samaeng M, Nawakitransan M. Population pharmacokinetics and Monte Carlo simulations of sulbactam to optimize dosage regimens in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Pharm Sci.* 2019;136:104940.
21. Lynch JP, Zhanel GG, Clark NM. Infections Due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment Options. *Semin Respir Crit Care Med.* 2017;38(3):311-25.
22. Huang Y, Zhou Q, Wang W, Huang Q, Liao J, Li J, *et al.* *Acinetobacter baumannii* Ventilator-Associated Pneumonia: Clinical Efficacy of Combined Antimicrobial Therapy and in vitro Drug Sensitivity Test Results. *Front Pharmacol.* 2019;10:92.
23. Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, *et al.* Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *J Infect.* 2012;64(3):282-90.
24. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010;362(19):1804-13.
25. Gootz TD, Marra A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6(3):309-25.
26. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, *et al.* Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for

- Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016;37(11):1288-301.
27. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* *Oxymoron*: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front Microbiol.* 2012;3:148.
 28. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(2):130-55.
 29. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(3).
 30. Di Venanzio G, Flores-Mireles AL, Calix JJ, Haurat MF, Scott NE, Palmer LD, *et al.* Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes. *Nat Commun.* 2019;10(1):2763.
 31. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, *et al.* New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* 2007;21(5):601-14.
 32. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. *J Chemother.* 2016;28(1):1-19.
 33. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis.* 2010;51(1):79-84.
 34. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ, Barrero-Almodóvar AE, García-Garmendia JL, Bernabeu-Wittell M, *et al.* Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin Infect Dis.* 2003;36(9):1111-8.
 35. Katragkou A, Roilides E. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* central nervous

- system infections with colistin. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4916-7.
36. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):409-47.
 37. Ritchie DJ, Garavaglia-Wilson A. A review of intravenous minocycline for treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis.* 2014;59 Suppl 6:S374-380.
 38. Lee YT, Tsao SM, Hsueh PR. Clinical outcomes of tigecycline alone or in combination with other antimicrobial agents for the treatment of patients with healthcare-associated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(9):1211-20.
 39. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(1):45-55.
 40. Taccone FS, Rodriguez-Villalobos H, De Backer D, De Moor V, Deviere J, Vincent JL, *et al.* Successful treatment of septic shock due to pan-resistant *Acinetobacter baumannii* using combined antimicrobial therapy including tigecycline. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25(4):257-60.
 41. Lob SH, Hoban DJ, Sahn DF, Badal RE. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47(4):317-23.
 42. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1-12.
 43. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(3):219-26.

44. Kim YJ, Kim SI, Kim YR, Hong KW, Wie SH, Park YJ, *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: diversity of resistant mechanisms and risk factors for infection. *Epidemiol Infect.* 2012;140(1):137-45.
45. Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. *Rev Infect Dis.* 1988;10(6):1220-5.
46. Cowan ST. A Review of Names for Coliform Organisms. *Intl. Bull. Bact. Nomen. Tax., Int. Bul. Nom. Tax.* 1954;4(2):119-24.
47. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):822-80.
48. Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife.* 2015;4.
49. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol.* 2017;123(3):570-81.
50. Kaper JB. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6-7):355-6.
51. Russo T. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 2003;5(5):449-56.
52. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(1):26-38.
53. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123-40.
54. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;358:3-32.
55. Nesta B, Pizza M. Vaccines Against *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;416:213-42.

56. Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, *et al.* In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(5):1691-6.
57. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. *Enterococci* in the Environment. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(4):685-706.
58. Ali L, Goraya MU, Arafat Y, Ajmal M, Chen JL, Yu D. Molecular Mechanism of Quorum-Sensing in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
59. Goh HMS, Yong MHA, Chong KKL, Kline KA. Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. *Virulence.* 2017;8(8):1525-62.
60. Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. Genomic transition of *Enterococci* from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16(1):10-6.
61. Kalina AP. The taxonomy and nomenclature of *Enterococci*. *Int. J. Syst. Bacteriol., IJSB.* 1970;20(2):185-9.
62. Parte AC. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucl Acids Res.* 2014;42(D1):D613-6.
63. Bhardwaj SB, Mehta M, Sood S, Sharma J. Isolation of a Novel Phage and Targeting Biofilms of Drug-Resistant Oral *Enterococci*. *J Glob Infect Dis.* 2020;12(1):11-5.
64. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(4):462-78.
65. Ho C, Lau A, Cimon K, Farrah K, Gardam M. Screening, Isolation, and Decolonization Strategies for Vancomycin-Resistant *Enterococci* or Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Organisms: A Systematic Review of the Clinical Evidence and Health Services Impact [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2012 [citado 8 de abril de 2020]. (CADTH Rapid Response Reports). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174613/>

66. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev. 1990;3(1):46-65.
67. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008;29(11):996-1011.
68. Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. Clin Microbiol Infect. 2010;16(6):555-62.
69. Tornero E, Senneville E, Euba G, Petersdorf S, Rodriguez-Pardo D, Lakatos B, et al. Characteristics of prosthetic joint infections due to *Enterococcus* sp. and predictors of failure: a multi-national study. Clin Microbiol Infect. 2014;20(11):1219-24.
70. Dean Z, Maltas J, Wood KB. Antibiotic interactions shape short-term evolution of resistance in *E. faecalis*. PLoS Pathog. 2020;16(3):e1008278.
71. Sun J, Song X. Assessment of antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from chronic periodontitis in biofilm versus planktonic phase. J Periodontol. 2011;82(4):626-31.
72. Balaei-Gajan E, Shirmohammadi A, Abashov R, Agazadeh M, Faramarzie M. Detection of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm of patients with chronic refractory periodontitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010;15(4):e667-670.
73. Soothill JS. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. J Med Microbiol. 1992;37(4):258-61.
74. Paulsen IT, Banerjee L, Myers GSA, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science. 2003;299(5615):2071-4.

75. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Enterococci*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(10):1221-36.
76. Ike Y. Pathogenicity of *Enterococci*. *Nippon Saikingaku Zasshi*. 2017;72(2):189-211.
77. Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MRC, Coque TM, Baquero F, Corander J, et al. Global Emergence and Dissemination of *Enterococci* as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? *Front Microbiol*. 2016;7:788.
78. Hallinen KM, Karlake J, Wood KB. Delayed antibiotic exposure induces population collapse in enterococcal communities with drug-resistant subpopulations. *Elife*. 2020;9.
79. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(27):E3574-3581.
80. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2018;45:131-9.
81. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(6):344-359.
82. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2014;9(9):1071-81.
83. Reyes J, Aguilar AC, Caicedo A. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Microbiology Key Points for Clinical Practice. *Int J Gen Med*. 2019;12:437-46.
84. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):252-75.
85. Gomez-Simmonds A, Greenman M, Sullivan SB, Tanner JP, Sowash MG, Whittier S, et al. Population Structure of *Klebsiella*

- pneumoniae* Causing Bloodstream Infections at a New York City Tertiary Care Hospital: Diversification of Multidrug-Resistant Isolates. Carroll KC, editor. J Clin Microbiol. 2015;53(7):2060-7.
86. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603.
 87. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JDD, Laupland KB. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. Am J Med. 2009;122(9):866-73.
 88. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 2019;32(3).
 89. Jagnow J. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiology. 2003;149(9):2397-405.
 90. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, et al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial Infections. Ann Intern Med. 2004;140(1):26-32.
 91. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. Lancet Infect Dis. 2013;13(9):785-96.
 92. Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Ertapenem resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. J Clin Microbiol. 2009;47(4):969-74.
 93. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(10):5873-84.
 94. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009;9(4):228-36.

95. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:249856.
96. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:39.
97. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1):177-92.
98. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, *et al*. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(5):698-722.
99. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013;67(3):159-73.
100. Kaiser SJ, Mutters NT, DeRosa A, Ewers C, Frank U, Günther F. Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(2):243-53.
101. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35(4):652-80.
102. Shurek KN, Breidenstein EBM, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: a persistent pathogen in cystic fibrosis and hospital-associated infections. En: Dougherty TH, Pucci MJ. *Antibiotic Discovery and Development*. New York: Springer; 2012. p. 679-715.
103. Stryjewski, M, Sexton DJ. *Pseudomonas aeruginosa* infections in specific types of patients and clinical settings. En: Hauser AR, Rello J. *Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 1-15.

104. Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet*. 2003;361(9374):2068-77.
105. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*. 2000;2(9):1051-60.
106. Lund-Palau H, Turnbull AR, Bush A, Bardin E, Cameron L, Soren O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Rev Respir Med*. 2016;10(6):685-97.
107. Ruiz L, Domínguez MA, Ruiz N, Viñas M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Arch Med Res*. 2004;35(3):251-7.
108. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):29-70.
109. Martin SJ, Yost RJ. Infectious Diseases in the Critically Ill Patients. *J Pharm Pract*. 2011;24(1):35-43.
110. Shupp JW, Pavlovich AR, Jeng JC, Pezzullo JC, Oetgen WJ, Jaskille AD, et al. Epidemiology of bloodstream infections in burn-injured patients: a review of the national burn repository. *J Burn Care Res*. 2010;31(4):521-8.
111. Gross J, Welch M. Why is *Pseudomonas aeruginosa* a common cause of infection in individuals with cystic fibrosis? *Future Microbiol*. 2013;8(6):697-9.
112. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*. 2010;15(7):1037-56.
113. Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(4):528-37.
114. Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol*. 2013;21(2):73-81.

115. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol.* 2014;68(1):1-12.
116. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002;34(5):634-40.
117. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):582-610.
118. Savoia D. New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Future Microbiol.* 2014;9(7):917-28.
119. Stefani S, Campana S, Cariani L, Carnovale V, Colombo C, Lleo MM, et al. Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol.* 2017;307(6):353-62.
120. Hancock REW, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat.* 2000;3(4):247-55.
121. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318-27.
122. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A Brief History of the *Pneumococcus* in Biomedical Research: A Panoply of Scientific Discovery. *Clin Infect Dis.* 1993;17(5):913-24.
123. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):871-99.
124. Engholm DH, Kilian M, Goodsell DS, Andersen ES, Kjærgaard RS. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(6):854-79.

125. Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, Isaacman DJ. *Streptococcus pneumoniae*: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention. *Pharmacotherapy*. 2005;25(9):1193-212.
126. Hackel M, Lascols C, Bouchillon S, Hilton B, Morgenstern D, Purdy J. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. *Vaccine*. 2013;31(42):4881-7.
127. Keller LE, Robinson DA, McDaniel LS. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. *MBio*. 2016;7(2):e01792.
128. Masomian M, Ahmad Z, Gew LT, Poh CL. Development of Next Generation *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Conferring Broad Protection. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(1).
129. Rayner RE, Savill J, Hafner LM, Huygens F. Genotyping *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2015;10(4):653-64.
130. Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:563-81.
131. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(6):355-67.
132. Tomasz A, Waks S. Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(10):4162-6.
133. Obregón V, García P, García E, Fenoll A, López R, García JL. Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J Clin Microbiol*. 2002;40(7):2545-54.
134. Yahiaoui RY, den Heijer CD, van Bijnen EM, Paget WJ, Pringle M, Goossens H, *et al*. Prevalence and antibiotic resistance of commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries. *Future Microbiol*. 2016;11:737-44.

135. Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(3):144-54.
136. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(4):288-301.
137. Chao Y, Marks LR, Pettigrew MM, Hakansson AP. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:194.
138. Marimon JM, Ardanuy C. Epidemiology of pneumococcal diseases in Spain after the introduction of pneumococcal conjugate vaccines. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020;
139. Musher DM, Thorner AR. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med*. 2014;371(17):1619-28.
140. Feldman C, Anderson R. Recent advances in our understanding of *Streptococcus pneumoniae* infection. *F1000Prime Rep*. 2014;6:82.
141. Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae's* Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front Immunol*. 2018;9:1366.
142. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The *Pneumococcus*: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(7).
143. Tin Tin Htar M, Stuurman AL, Ferreira G, Alicino C, Bollaerts K, Paganino C, *et al*. Effectiveness of pneumococcal vaccines in preventing pneumonia in adults, a systematic review and meta-analyses of observational studies. *PLoS ONE*. 2017;12(5):e0177985.
144. Ortvist A, Hedlund J, Kalin M. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and clinical features. *Semin Respir Crit Care Med*. 2005;26(6):563-74.
145. Torres A, Blasi F, Dartois N, Akova M. Which individuals are at increased risk of pneumococcal disease and why? Impact of

- COPD, asthma, smoking, diabetes, and/or chronic heart disease on community-acquired pneumonia and invasive pneumococcal disease. *Thorax*. 2015;70(10):984-9.
146. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009;374(9700):1543-56.
 147. Varon E. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Med Mal Infect*. 2012;42(8):361-5.
 148. Wroe PC, Finkelstein JA, Ray GT, Linder JA, Johnson KM, Rifas-Shiman S, *et al*. Aging population and future burden of pneumococcal pneumonia in the United States. *J Infect Dis*. 2012;205(10):1589-92.
 149. Lynch J, Zhanel G. *Streptococcus pneumoniae* : Epidemiology, Risk Factors, and Strategies for Prevention. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009;30(02):189-209.
 150. Bergman M, Huikko S, Huovinen P, Paakkari P, Seppälä H, Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe Network). Macrolide and azithromycin use are linked to increased macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(11):3646-50.
 151. Keenan JD, Klugman KP, McGee L, Vidal JE, Chochua S, Hawkins P, *et al*. Evidence for clonal expansion after antibiotic selection pressure: pneumococcal multilocus sequence types before and after mass azithromycin treatments. *J Infect Dis*. 2015;211(6):988-94.
 152. Leonard A, Möhrlis K, Schlüter R, Taylor E, Lalk M, Methling K. Exploring metabolic adaptation of *Streptococcus pneumoniae* to antibiotics. *J Antibiot*. 2020; 73(7):441-454.
 153. Eyler RF, Shvets K. Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(7):1080-90.
 154. Calvo J, Martínez-Martínez L. [Antimicrobial mechanisms of action]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(1):44-52.

155. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem.* 1962;5:1063-5.
156. Koga H, Itoh A, Murayama S, Suzue S, Irikura T. Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J Med Chem.* 1980;23(12):1358-63.
157. Davis R, Markham A, Balfour JA. Ciprofloxacin. An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs.* 1996;51(6):1019-74.
158. Dembry LM, Roberts JC, Schock KD, Marino SP, Farrel PA, Andriole VT. Comparison of in vitro activity of trovafloxacin against Gram-positive and Gram-negative organisms with quinolones and beta-lactam antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;31(1):301-11.
159. Bhatt S, Chatterjee S. Fluoroquinolone antibiotics: Occurrence, mode of action, resistance, environmental detection, and remediation - A comprehensive review. *Environ Pollut.* 2022;315:120440.
160. Bryskier A, Chantot JF. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs.* 1995;49 Suppl 2:16-28.
161. Brighty KE, Gootz TD. The chemistry and biological profile of trovafloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39 Suppl B:1-14.
162. Bush NG, Diez-Santos I, Abbott LR, Maxwell A. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules.* 2020;25(23):5662.
163. Hooper DC. Quinolone mode of action. *Drugs.* 1995;49 Suppl 2:10-5.
164. Shen LL, Baranowski J, Pernet AG. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: specificity and cooperativity of drug binding to DNA. *Biochemistry.* 1989;28(9):3879-85.

165. Piddock LJ, Jin YF, Ricci V, Asuquo AE. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43(1):61-70.
166. Bryan LE, Bedard J, Wong S, Chamberland S. Quinolone antimicrobial agents: mechanism of action and resistance development. *Clin Invest Med.* 1989;12(1):14-9.
167. Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2001;32 Suppl 1:S9-15.
168. Hoshino K, Kitamura A, Morrissey I, Sato K, Kato J, Ikeda H. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(11):2623-7.
169. Peng H, Marians KJ. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem.* 1993;268(32):24481-90.
170. Saiki AY, Shen LL, Chen CM, Baranowski J, Lerner CG. DNA cleavage activities of *Staphylococcus aureus* gyrase and topoisomerase IV stimulated by quinolones and 2-pyridones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(7):1574-7.
171. Gellert M. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:879-910.
172. Drlica K. Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol Rev.* 1984;48(4):273-89.
173. Zhanel GG, Ennis K, Vercaigne L, Walkty A, Gin AS, Embil J, *et al.* A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Drugs.* 2002;62(1):13-59.
174. Hooper DC, Wolfson JS. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N Engl J Med.* 1991;324(6):384-94.
175. Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell.* 1990;63(2):393-404.

176. Malik M, Zhao X, Drlica K. Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Mol Microbiol.* 2006;61(3):810-25.
177. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):385-92.
178. Gutierrez A, Stokes JM, Matic I. Our Evolving Understanding of the Mechanism of Quinolones. *Antibiotics (Basel).* 2018;7(2):32.
179. Blanche F, Cameron B, Bernard FX, Maton L, Manse B, Ferrero L, et al. Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(12):2714-20.
180. Pan XS, Fisher LM. *Streptococcus pneumoniae* DNA gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(5):1129-36.
181. Onodera Y, Uchida Y, Tanaka M, Sato K. Dual inhibitory activity of sitafloxacin (DU-6859a) against DNA gyrase and topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 1999;44(4):533-6.
182. Morrissey I, George JT. Purification of pneumococcal type II topoisomerases and inhibition by gemifloxacin and other quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45 Suppl 1:101-6.
183. Gootz TD, Zaniewski R, Haskell S, Schmieder B, Tankovic J, Girard D, et al. Activity of the new fluoroquinolone trovafloxacin (CP-99,219) against DNA gyrase and topoisomerase IV mutants of *Streptococcus pneumoniae* selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(12):2691-7.
184. Fukuda H, Hiramatsu K. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(2):410-2.
185. Heaton VJ, Ambler JE, Fisher LM. Potent antipneumococcal activity of gemifloxacin is associated with dual targeting of

- gyrase and topoisomerase IV, an in vivo target preference for gyrase, and enhanced stabilization of cleavable complexes in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(11):3112-7.
186. Adams RA, Leon G, Miller NM, Reyes SP, Thantrong CH, Thokkadam AM, *et al.* Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure. *J Antibiot (Tokyo).* 2021;74(11):786-98.
 187. Villain-Guillot P, Bastide L, Gualtieri M, Leonetti JP. Progress in targeting bacterial transcription. *Drug Discov Today.* 2007;12(5-6):200-8.
 188. Zhang J, Ba Y, Wang S, Yang H, Hou X, Xu Z. Nitroimidazole-containing compounds and their antibacterial and antitubercular activities. *Eur J Med Chem.* 2019;179:376-88.
 189. Zuma NH, Aucamp J, N'Da DD. An update on derivatisation and repurposing of clinical nitrofurans drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2019;140:105092.
 190. Radkov AD, Hsu YP, Booher G, VanNieuwenhze MS. Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Annu Rev Biochem.* 2018;87:991-1014.
 191. Koch AL. Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(4):673-87.
 192. Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(4):585-607.
 193. Rice KC, Bayles KW. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72(1):85-109.
 194. Tommasi R, Brown DG, Walkup GK, Manchester JI, Miller AA. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(8):529-42.
 195. Lima LM, Silva BNM da, Barbosa G, Barreiro EJ. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem.* 2020;208:112829.

196. Gootz TD. Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(1):13-31.
197. De Rosa M, Verdino A, Soriente A, Marabotti A. The Odd Couple(s): An Overview of Beta-Lactam Antibiotics Bearing More Than One Pharmacophoric Group. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):617.
198. Kitano K, Tomasz A. Triggering of autolytic cell wall degradation in *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;16(6):838-48.
199. Zeng D, Debabov D, Hartsell TL, Cano RJ, Adams S, Schuyler JA, *et al.* Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(12):a026989.
200. Tian L, Shi S, Zhang X, Han F, Dong H. Newest perspectives of glycopeptide antibiotics: biosynthetic cascades, novel derivatives, and new appealing antimicrobial applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 2023;39(2):67.
201. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(2):321-47.
202. Falagas ME, Athanasaki F, Voulgaris GL, Triarides NA, Vardakas KZ. Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53(1):22-8.
203. Batson S, de Chiara C, Majce V, Lloyd AJ, Gobec S, Rea D, *et al.* Inhibition of D-Ala:D-Ala ligase through a phosphorylated form of the antibiotic D-cycloserine. *Nat Commun.* 2017;8(1):1939.
204. Schalock PC, Zug KA. Bacitracin. *Cutis.* 2005;76(2):105-7.
205. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(1):35-48.
206. Hermann T. Drugs targeting the ribosome. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(3):355-66.

207. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):727-37.
208. Lacy MK, Nicolau DP, Nightingale CH, Quintiliani R. The pharmacodynamics of aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 1998;27(1):23-7.
209. Lambert T. Antibiotics that affect the ribosome. *Rev Sci Tech.* 2012;31(1):57-64.
210. Ogle JM, Ramakrishnan V. Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:129-77.
211. Shandrick S, Zhao Q, Han Q, Ayida BK, Takahashi M, Winters GC, *et al.* Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004;43(24):3177-82.
212. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70(2):140-50.
213. Duggar BM. Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann N Y Acad Sci.* 1948;51(Art. 2):177-81.
214. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem.* 2014;395(5):559-75.
215. Tuckman M, Petersen PJ, Howe AYM, Orlowski M, Mullen S, Chan K, *et al.* Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3205-11.
216. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(5):895-904.
217. Roy S, Datta S, Viswanathan R, Singh AK, Basu S. Tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* causing

- neonatal septicaemia (2007-10) and role of an efflux pump in tigecycline non-susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(5):1036-42.
218. Shlaes DM. An update on tetracyclines. *Curr Opin Investig Drugs.* 2006;7(2):167-71.
219. Wilson DN. The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2009;44(6):393-433.
220. Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science.* 2009;325(5944):1089-93.
221. Kannan K, Mankin AS. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1241:33-47.
222. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(7):1267-72.
223. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol.* 2003;330(5):1005-14.
224. Retsema J, Fu W. Macrolides: structures and microbial targets. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18 Suppl 1:S3-10.
225. Nilius AM, Ma Z. Ketolides: the future of the macrolides? *Curr Opin Pharmacol.* 2002;2(5):493-500.
226. Vara Prasad JVN. New oxazolidinones. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(5):454-60.
227. Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist Updat.* 2014;17(1-2):1-12.

228. Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(12):3251-5.
229. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):603-12.
230. Dunkle JA, Xiong L, Mankin AS, Cate JHD. Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(40):17152-7.
231. Tu D, Blaha G, Moore PB, Steitz TA. Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell.* 2005;121(2):257-70.
232. Spížek J, Rezanka T. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64(4):455-64.
233. Powell DA, Nahata MC. Chloramphenicol: new perspectives on an old drug. *Drug Intell Clin Pharm.* 1982;16(4):295-300.
234. Pongs O, Bald R, Erdmann VA. Identification of chloramphenicol-binding protein in *Escherichia coli* ribosomes by affinity labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70(8):2229-33.
235. Bhuta P, Chung HL, Hwang JS, Zemlicka J. Analogues of chloramphenicol: circular dichroism spectra, inhibition of ribosomal peptidyltransferase, and possible mechanism of action. *J Med Chem.* 1980;23(12):1299-305.
236. Michelinaki M, Mamos P, Coutsogeorgopoulos C, Kalpaxis DL. Aminoacyl and peptidyl analogs of chloramphenicol as slow-binding inhibitors of ribosomal peptidyltransferase: a new approach for evaluating their potency. *Mol Pharmacol.* 1997;51(1):139-46.
237. Rheinberger HJ, Nierhaus KH. Partial release of AcPhe-Phe-tRNA from ribosomes during poly(U)-dependent poly(Phe) synthesis and the effects of chloramphenicol. *Eur J Biochem.* 1990;193(3):643-50.

238. Polacek N, Gomez MJ, Ito K, Xiong L, Nakamura Y, Mankin A. The critical role of the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination. *Mol Cell*. 2003;11(1):103-12.
239. Hansen JL, Moore PB, Steitz TA. Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol*. 2003;330(5):1061-75.
240. Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, *et al*. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*. 2001;413(6858):814-21.
241. Celma ML, Monro RE, Vazquez D. Substrate and antibiotic binding sites at the peptidyl transferase centre of *E. coli* ribosomes: Binding of UACCA-Leu to 50 S subunits. *FEBS Lett*. 1971;13(4):247-51.
242. Ulbrich B, Mertens G, Nierhaus KH. Cooperative binding of 3'-fragments of transfer ribonucleic acid to the peptidyltransferase center of *Escherichia coli* ribosomes. *Arch Biochem Biophys*. 1978;190(1):149-54.
243. Auerbach T, Bashan A, Yonath A. Ribosomal antibiotics: structural basis for resistance, synergism and selectivity. *Trends Biotechnol*. 2004;22(11):570-6.
244. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40(9):1333-41.
245. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81.
246. Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs*. 2009;69(14):1879-901.

247. Sabnis A, Hagart KL, Klöckner A, Becce M, Evans LE, Furniss RCD, *et al.* Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *Elife*. 2021;10:e65836.
248. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, *et al.* Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(9):589-601.
249. Kanafani ZA, Corey GR. Daptomycin: a rapidly bactericidal lipopeptide for the treatment of Gram-positive infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(2):177-84.
250. Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*. 2001;32(3-4):261-73.
251. Masters PA, O'Bryan TA, Zurlo J, Miller DQ, Joshi N. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Arch Intern Med*. 2003;163(4):402-10.
252. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl 1):S3-10; discussion S62-70.
253. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep*. 2020;21(12):e51034.
254. Wang X, Li T. Current problems with the antibiotic-resistant bacteria and multiresistance bacteria. En: Singh P and Sillanpää M. Degradation of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Various Sources [Internet]. Elsevier. 2023 [citado 5 de marzo de 2024]. p. 89-115. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032399866600167>
255. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 2000;406(6797):775-81.
256. Antimicrobial Resistance Collaborators. The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. *Lancet Reg Health Am*. 2023;25:100561.

257. Li T, Wang Z, Guo J, de la Fuente-Nunez C, Wang J, Han B, *et al.* Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health. *Sci Total Environ.* 2023;860:160461.
258. WHO 2019. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. World Health Organization.
259. WHO 2021. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report. World Health Organization.
260. Que M, Cao W, Zhang H, Shi L, Ye L. The prevalence, antibiotic resistance and multilocus sequence typing of colistin-resistant bacteria isolated from *Penaeus vannamei* farms in earthen ponds and HDPE film-lined ponds in China. *J Fish Dis.* 2022;45(9):1289-99.
261. Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR. Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:677720.
262. O'Neil J. Tackling Drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016. Government of the United Kingdom.
263. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(3):e00181-19.
264. GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet.* 2022;400(10369):2221-48.
265. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1645-58.
266. Kobeissi E, Menassa M, Moussally K, Repetto E, Soboh I, Hajjar M, *et al.* The socioeconomic burden of antibiotic resistance in

- conflict-affected settings and refugee hosting countries: a systematic scoping review. *Confl Health*. 2021;15(1):21.
267. Zhen X, Lundborg CS, Sun X, Hu X, Dong H. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:137.
268. Kotwani A, Joshi J, Kaloni D. Pharmaceutical effluent: a critical link in the interconnected ecosystem promoting antimicrobial resistance. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021;28(25):32111-24.
269. Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(5):257-69.
270. Subramaniam G, Girish M. Antibiotic Resistance - A Cause for Reemergence of Infections. *Indian J Pediatr*. 2020;87(11):937-44.
271. Alós JI. Antibiotic resistance: A global crisis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(10):692-9.
272. Organización Mundial de la Salud. [Internet]. OMS 2020. [Citada 31 julio 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
273. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):147-79.
274. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(1):42-51.
275. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):20-51.
276. Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*. 2002;(31):55S-64S.
277. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol*. 2014;4:422.

278. Abushaheen MA, Muzaaheed null, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Dis Mon.* 2020;100971.
279. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 2016;4(2).
280. Sandoval-Motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016;8(3):253-67.
281. Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H. Resistance mechanisms. *Ann Transl Med.* 2016;4(17):326.
282. Partridge SR. Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Pathology.* 2015;47(3):276-84.
283. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:107.
284. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):593-656.
285. Winterhalter M, Ceccarelli M. Physical methods to quantify small antibiotic molecules uptake into Gram-negative bacteria. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;95(Pt A):63-7.
286. Ghai I, Ghai S. Exploring bacterial outer membrane barrier to combat bad bugs. *Infect Drug Resist.* 2017;10:261-73.
287. Arber W. Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *Life (Basel).* 2014;4(2):217-24.
288. Krüger NJ, Stingl K. Two steps away from novelty--principles of bacterial DNA uptake. *Mol Microbiol.* 2011;80(4):860-7.
289. Zhou G, Shi QS, Huang XM, Xie XB. The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):21711-33.

290. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, *et al.* IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(5):1522-8.
291. Akrami F, Rajabnia M, Pournajaf A. Resistance integrons; A Mini review. *Caspian J Intern Med.* 2019;10(4):370-6.
292. Kenna DT, Doherty CJ, Foweraker J, Macaskill L, Barcus VA, Govan JRW. Hypermotability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology (Reading, Engl).* 2007;153(Pt 6):1852-9.
293. Jayaraman R. Mutators and hypermutability in bacteria: the *Escherichia coli* paradigm. *J Genet.* 2009;88(3):379-91.
294. Henderson JC, Zimmerman SM, Crofts AA, Boll JM, Kuhns LG, Herrera CM, *et al.* The Power of Asymmetry: Architecture and Assembly of the Gram-Negative Outer Membrane Lipid Bilayer. *Annu Rev Microbiol.* 2016;70:255-78.
295. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:17-38.
296. Masi M, Winterhalter M, Pagès JM. Outer Membrane Porins. *Subcell Biochem.* 2019;92:79-123.
297. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(12):893-903.
298. Choi U, Lee CR. Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2019;10:953.
299. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 2000;37(2):239-53.
300. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794(5):808-16.

301. Chapman JS, Georgopapadakou NH. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(4):438-42.
302. Ghai I, Ghai S. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infect Drug Resist*. 2018;11:523-30.
303. Darby EM, Trampani E, Siasat P, Gaya MS, Alav I, Webber MA, *et al*. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(5):280-95.
304. Sugiyama M, Kumagai T. Molecular and structural biology of bleomycin and its resistance determinants. *J Biosci Bioeng*. 2002;93(2):105-16.
305. Fleitas O, Agbale CM, Franco OL. Bacterial resistance to antimicrobial peptides: an evolving phenomenon. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21(5):1013-38.
306. Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol*. 2018;9:2928.
307. Ball PR, Shales SW, Chopra I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980;93(1):74-81.
308. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(7):3974-7.
309. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(2):185-230.
310. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2475067.

311. Zárata SG, Morales P, Świderek K, Bolanos-Garcia VM, Bastida A. A Molecular Modeling Approach to Identify Novel Inhibitors of the Major Facilitator Superfamily of Efflux Pump Transporters. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(1).
312. Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJV. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2014;9(10):1165-77.
313. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(2):254-67.
314. Paulsen IT. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6(5):446-51.
315. Piddock LJV. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(8):629-36.
316. Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):672-93.
317. Saier MH, Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J*. 1998;12(3):265-74.
318. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(4):457-70.
319. Verhalen B, Dastvan R, Thangapandian S, Peskova Y, Koteiche HA, Nakamoto RK, *et al*. Energy transduction and alternating access of the mammalian ABC transporter P-glycoprotein. *Nature*. 2017;543(7647):738-41.
320. Choudhury HG, Tong Z, Mathavan I, Li Y, Iwata S, Zirah S, *et al*. Structure of an antibacterial peptide ATP-binding cassette transporter in a novel outward occluded state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(25):9145-50.

321. Hürlimann LM, Hohl M, Seeger MA. Split tasks of asymmetric nucleotide-binding sites in the heterodimeric ABC exporter EfrCD. *FEBS J.* 2017;284(11):1672-87.
322. Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. Novel Macrolide-Specific ABC-Type Efflux Transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2001;183(19):5639-44.
323. Ehrnstorfer IA, Manatschal C, Arnold FM, Laederach J, Dutzler R. Structural and mechanistic basis of proton-coupled metal ion transport in the SLC11/NRAMP family. *Nat Commun.* 2017;8:14033.
324. Law CJ, Maloney PC, Wang DN. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:289-305.
325. Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Rodríguez-Baño J, Bou G, *et al.* Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24(2):77-80.
326. Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, *et al.* Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5247-57.
327. Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H⁺-Coupled *Acinetobacter baumannii* Multidrug Efflux Pump Belonging to the MATE Family of Transporters. *AAC.* 2005;49(10):4362-4.
328. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Trynieszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*--the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(3):257-67.
329. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(12):3375-80.

330. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3298-304.
331. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(6):1210-5.
332. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, *et al.* Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2006;2(1):e7.
333. Forsberg KJ, Patel S, Wencewicz TA, Dantas G. The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Chem Biol.* 2015;22(7):888-97.
334. Lee YD, Park JH. Phage Conversion for β -Lactam Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* from Foods. *J Microbiol Biotechnol.* 2016;26(2):263-9.
335. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, *et al.* Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e34953.
336. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):160-201.
337. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci.* 1980;289(1036):321-31.
338. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76.
339. Biondi S, Long S, Panunzio M, Qin WL. Current trends in β -lactam based β -lactamases inhibitors. *Curr Med Chem.* 2011;18(27):4223-36.
340. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(4):228-36.

341. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58.
342. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods.* 2014;107:106-18.
343. Poole K. *Pseudomonas Aeruginosa*: Resistance to the Max. *Front Microbiol.* 2011 Apr 5;2:65.
344. Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(17):2200-23.
345. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-82.
346. Kumburu HH, Sonda T, van Zwetselaar M, Leekitcharoenphon P, Lukjancenko O, Mmbaga BT, *et al.* Using WGS to identify antibiotic resistance genes and predict antimicrobial resistance phenotypes in MDR *Acinetobacter baumannii* in Tanzania. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(6):1484-93.
347. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(2):123-30.
348. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, *et al.* Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:55.
349. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010;13(6):151-71.
350. Wondrack L, Massa M, Yang BV, Sutcliffe J. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(4):992-8.
351. Cundliffe E. Glycosylation of macrolide antibiotics in extracts of *Streptomyces lividans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(2):348-52.

352. Vilches C, Hernandez C, Mendez C, Salas JA. Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism, *Streptomyces antibioticus*. J Bacteriol. 1992;174(1):161-5.
353. Weisblum B. Macrolide resistance. Drug Resist Updat. 1998;1(1):29-41.
354. Baquero F, Levin BR. Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. Nat Rev Microbiol. 2021;19(2):123-32.
355. Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Chem Commun (Camb). 2011;47(14):4055-61.
356. Chambers HF. Methicillin-resistant *Staphylococci*. Clin Microbiol Rev. 1988;1(2):173-86.
357. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother. 2003;51(5):1109-17.
358. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends Microbiol. 2014;22(8):438-45.
359. Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. FEMS Microbiol Lett. 2008;282(2):147-59.
360. Hejnar P, Kolár M, Hájek V. Characteristics of *Acinetobacter* strains (phenotype classification, antibiotic susceptibility and production of beta-lactamases) isolated from haemocultures from patients at the Teaching Hospital in Olomouc. Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med. 1999;142:73-7.
361. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, *et al.* Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(9):2946-50.
362. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(8):5638-42.

363. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1354(1):12-31.
364. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(9):a025320.
365. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):118-25.
366. Craft KM, Nguyen JM, Berg LJ, Townsend SD. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *Med Chem Commun.* 2019;10(8):1231-41.
367. Saxena P, Joshi Y, Rawat K, Bisht R. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian J Microbiol.* 2019;59(1):3-12.
368. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(7):a000398.
369. Das T, Sehar S, Manefield M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(6):778-86.
370. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Dis.* 2002;8(9):881-90.
371. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.
372. Prakash B, Veeregowda BM, Krishnappa G. Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Curr Sci.* 2003;85(9):1299-307.
373. Zhao A, Sun J, Liu Y. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1137947.

374. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2020;84(3):e00026-19.
375. Chiba A, Seki M, Suzuki Y, Kinjo Y, Mizunoe Y, Sugimoto S. *Staphylococcus aureus* utilizes environmental RNA as a building material in specific polysaccharide-dependent biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2022;8(1):17.
376. Sadiq FA, Burmølle M, Heyndrickx M, Flint S, Lu W, Chen W, *et al.* Community-wide changes reflecting bacterial interspecific interactions in multispecies biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 2021;47(3):338-58.
377. Kranjec C, Morales Angeles D, Torrissen Mårli M, Fernández L, García P, Kjos M, *et al.* Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(2):131.
378. Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res.* 1991;37:91-105.
379. Kanwar I, Sah AK, Suresh PK. Biofilm-mediated Antibiotic-resistant Oral Bacterial Infections: Mechanism and Combat Strategies. *Curr Pharm Des.* 2017;23(14):2084-2095.
380. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 2003;5(13):1213-9.
381. Vega NM, Gore J. Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Curr Opin Microbiol.* 2014;21:28-34.
382. Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib NE. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol.* 2014;196(7):453-72.
383. Billings N, Millan M, Caldara M, Rusconi R, Tarasova Y, Stocker R, *et al.* The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003526.

384. Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol.* 2000;88(1):22-30.
385. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-22.
386. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1):317-23.
387. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:107-31.
388. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:357-72.
389. Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell.* 2014;157(3):539-48.
390. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(8):453-64.
391. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews.* 2017;41(3):430-49.
392. Shultis MW, Mulholland CV, Berney M. Are all antibiotic persisters created equal? *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:933458.
393. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1749-55.
394. Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991;29(3):533-8.

395. Jenkins SG, Schuetz AN. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(3):290-308.
396. Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.* 1971;217:Suppl 217:1+.
397. Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover J. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. En: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, *et al.* *Manual of Clinical Microbiology.* 11^a ed. Wiley; 2007. p. 1152-72.
398. Feßler AT, Wang Y, Burbick CR, Diaz-Campos D, Fajt VR, Lawhon SD, *et al.* Antimicrobial susceptibility testing in veterinary medicine: performance, interpretation of results, best practices and pitfalls. *One Health Adv.* 2023;1(26).
399. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved standard M7-A9.* 9th ed.; Wayne, PA. CLSI publication; 2012.
400. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A10.* Wayne, PA. CLSI publication; 2009.
401. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493-6.
402. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Informational supplement M100.* 34th Edition. Wayne, PA. CLSI publication; 2024.
403. Korgenski EK, Daly JA. Evaluation of the BIOMIC video reader system for determining interpretive categories of isolates on the basis of disk diffusion susceptibility results. *J Clin Microbiol.* 1998;36(1):302-4.
404. Nijs A, Cartuyvels R, Mewis A, Peeters V, Rummens JL, Magerman K. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan

- 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3627-30.
405. Huang MB, Baker CN, Banerjee S, Tenover FC. Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of *Staphylococci*, *Enterococci*, *Campylobacter jejuni*, and Gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol.* 1992;30(12):3243-8.
406. Jorgensen JH, Ferraro MJ, McElmeel ML, Spargo J, Swenson JM, Tenover FC. Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporin resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates by use of the E test. *J Clin Microbiol.* 1994;32(1):159-63.
407. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991;29(10):2197-203.
408. Pfaller MA, Jones RN, Microbiology Resource Committee, College of American Pathologists. Performance accuracy of antibacterial and antifungal susceptibility test methods: report from the College of American Pathologists Microbiology Surveys Program (2001-2003). *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130(6):767-78.
409. Prakash V, Lewis JS, Jorgensen JH. Vancomycin MICs for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Differ Based upon the Susceptibility Test Method Used. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2008;52(12):4528-4528.
410. Stager CE, Davis JR. Automated systems for identification of microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews.* 1992;5(3):302-27.
411. Felmingham D, Brown DFJ. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2001;48(suppl_1):81-5.
412. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Shubert C, Thomson KS, Boeufgras JM, *et al.* Ability of the VITEK 2 advanced expert system To identify beta-lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):570-4.

413. Richter SS, Ferraro MJ. Susceptibility Testing Instrumentation and Computerized Expert Systems for Data Analysis and Interpretation. En: Versalovic J, Jorgensen JH, Funke G, Warnock DW, Landry ML, Carroll KC, editores. Manual of Clinical Microbiology [Internet]. 10th Edition. American Society of Microbiology. 2011 [citado 29 de junio de 2019]. p. 1144-54. Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816728.chap69>
414. Croxatto A, Prod'hom G, Durussel C, Greub G. Preparation of a blood culture pellet for rapid bacterial identification and antibiotic susceptibility testing. J Vis Exp. 2014;(92):e51985.
415. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. Diagnostics (Basel). 2019;9(2):49.
416. Fredborg M, Andersen KR, Jørgensen E, Droce A, Olesen T, Jensen BB, *et al.* Real-time optical antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol. 2013;51(7):2047-53.
417. Postek W, Pacocha N, Garstecki P. Microfluidics for antibiotic susceptibility testing. Lab Chip. 2022;22(19):3637-62.
418. Roveta S, Marchese A, Debbia EA. Antibiotic susceptibility tests directly on urine samples using Uro-Quick, a rapid automated system. J Chemother. 2006;18(1):12-9.
419. Cerca F, Trigo G, Correia A, Cerca N, Azeredo J, Vilanova M. SYBR green as a fluorescent probe to evaluate the biofilm physiological state of *Staphylococcus epidermidis*, using flow cytometry. Can J Microbiol. 2011;57(10):850-6.
420. Barbesti S, Citterio S, Labra M, Baroni MD, Neri MG, Sgorbati S. Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria. Cytometry. 2000;40(3):214-8.
421. Feng J, Wang T, Zhang S, Shi W, Zhang Y. An optimized SYBR Green I/PI assay for rapid viability assessment and antibiotic susceptibility testing for *Borrelia burgdorferi*. PLoS ONE. 2014;9(11):e111809.

422. Baraban L, Bertholle F, Salverda MLM, Bremond N, Panizza P, Baudry J, *et al.* Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab on a Chip*. 2011;11(23):4057.
423. Maugeri G, Lychko I, Sobral R, Roque ACA. Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents: A Review of Current and Future Trends. *Biotechnol J*. 2019;14(1):e1700750.
424. March-Rosselló GA. Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(3):182-8.
425. Prod'homme G, Durussel C, Blanc D, Croxatto A, Greub G. Early detection of extended-spectrum β -lactamase from blood culture positive for an *Enterobacteriaceae* using β LACTA test. *New Microbes New Infect*. 2015;8:1-3.
426. Tajima Y, Komatsu M, Ito T, Hiramatsu K. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* strains having reduced susceptibility to vancomycin using a chemiluminescence-based drug-susceptibility test. *J Microbiol Methods*. 2007;70(3):434-41.
427. Wheat PF, Hastings JG, Spencer RC. Rapid antibiotic susceptibility tests on *Enterobacteriaceae* by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol*. 1988;25(2):95-9.
428. Wheat PF, Spencer RC, Hastings JG. A novel luminometer for rapid antimicrobial susceptibility tests on gram-positive cocci by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol*. 1989;29(4):277-82.
429. Thore A, Nilsson L, Höjer H, Anséhn S, Bröte L. Effects of ampicillin on intracellular levels of adenosine triphosphate in bacterial cultures related to antibiotic susceptibility. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. 1977;85(2):161-6.
430. Barton AP. A rapid bioluminescent method for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonies. *J Antimicrob Chemother*. 1985;15(1):61-7.
431. March Rosselló GA, García-Loygorri Jordán de Urries MC, Gutiérrez Rodríguez MP, Simarro Grande M, Orduña Domingo

- A, Bratos Pérez MÁ. A two-hour antibiotic susceptibility test by ATP-bioluminescence. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34(6):334-9.
432. Dai T, Xie J, Buonomo JA, Moreno A, Banaei N, Bertozzi CR, *et al*. Bioluminogenic Probe for Rapid, Ultrasensitive Detection of β -Lactam-Resistant Bacteria. *Anal Chem*. 2023;95(18):7329-35.
433. Tawil N, Sacher E, Mandeville R, Meunier M. Bacteriophages: biosensing tools for multi-drug resistant pathogens. *Analyst*. 2014;139(6):1224-36.
434. Lü B, Fu Z, Xu S. Rapid rifampicin susceptibility test by using recombinant mycobacteriophages. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2000;23(8):480-4.
435. Klumpp J, Loessner MJ. Detection of bacteria with bioluminescent reporter bacteriophage. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2014;144:155-71.
436. Mardh PA, Ripa T, Andersson KE, Wadso I. Kinetics of the Actions of Tetracyclines on *Escherichia coli* as Studied by Microcalorimetry. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;10(4):604-9.
437. Baldoni D, Hermann H, Frei R, Trampuz A, Steinhuber A. Performance of microcalorimetry for early detection of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):774-6.
438. Hoettges KF, Dale JW, Hughes MP. Rapid determination of antibiotic resistance in *E. coli* using dielectrophoresis. *Phys Med Biol*. 2007;52(19):6001-9.
439. Guliy OI, Evstigneeva SS, Karavaeva OA. Antimicrobial Resistance and Current Methods for its Detection. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2023;15(3):19.
440. Guliy OI, Zaitsev BD, Smirnov AV, Karavaeva OA, Burygin GL, Borodina IA. Microwave resonator-based sensor system for specific antibody detection. *Int J Biol Macromol*. 2023;242(Pt 1):124613.

441. Guliy OI, Zaitsev BD, Borodina IA. Electroacoustic Biosensor Systems for Evaluating Antibiotic Action on Microbial Cells. *Sensors (Basel)*. 2023;23(14):6292.
442. Wang K, Li S, Petersen M, Wang S, Lu X. Detection and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nanomaterials (Basel)*. 2018;8(10):762.
443. Hassanain WA, Johnson CL, Faulds K, Graham D, Keegan N. Recent advances in antibiotic resistance diagnosis using SERS: focus on the «Big 5» challenges. *Analyst*. 2022;147(21):4674-700.
444. Patel R. New Developments in Clinical Bacteriology Laboratories. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(10):1448-59.
445. van Belkum A, Welker M, Erhard M, Chatellier S. Biomedical mass spectrometry in today's and tomorrow's clinical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1513-7.
446. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3321-4.
447. Hooff GP, van Kampen JJA, Meesters RJW, van Belkum A, Goessens WHF, Luijckx TM. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2012;11(1):79-84.
448. Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3222-7.
449. Broeren M a. C, Maas Y, Retera E, Arents NLA. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(3):286-91.
450. March GA, García-Loygorri MC, Simarro M, Gutiérrez MP, Orduña A, Bratos MA. A new approach to determine the susceptibility of bacteria to antibiotics directly from positive

- blood culture bottles in two hours. *J Microbiol Methods*. 2015;109:49-55.
451. Cockerill FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(2):199-212.
452. Beuving J, Verbon A, Gronthoud FA, Stobberingh EE, Wolffs PFG. Antibiotic susceptibility testing of grown blood cultures by combining culture and real-time polymerase chain reaction is rapid and effective. *PLoS One*. 2011;6(12):e27689.
453. Cleven BEE, Palka-Santini M, Gielen J, Meembor S, Krönke M, Krut O. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J Clin Microbiol*. 2006;44(7):2389-97.
454. Persing DH, Tenover FC, Hayden RT, Ieven M, Miller MB, Nolte FS, *et al*. *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2016. 835 p.
455. Rolain JM, Mallet MN, Fournier PE, Raoult D. Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(2):538-41.
456. Schoepp NG, Schlappi TS, Curtis MS, Butkovich SS, Miller S, Humphries RM, *et al*. Rapid pathogen-specific phenotypic antibiotic susceptibility testing using digital LAMP quantification in clinical samples. *Sci Transl Med*. 2017;9(410):eaal3693.
457. Ota Y, Furuhashi K, Nanba T, Yamanaka K, Ishikawa J, Nagura O, *et al*. A rapid and simple detection method for phenotypic antimicrobial resistance in *Escherichia coli* by loop-mediated isothermal amplification. *J Med Microbiol*. 2019;68(2):169-77.
458. Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, Freije CA, Metsky HC, Yang DK, *et al*. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature*. 2020;582(7811):277-82.
459. Thakku SG, Ackerman CM, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Ma P, *et al*. Multiplexed detection of bacterial nucleic acids using Cas13 in droplet microarrays. *PNAS Nexus*. 2022;1(1):pgac021.

460. Dunne WM, Jaillard M, Rochas O, Van Belkum A. Microbial genomics and antimicrobial susceptibility testing. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(3):257-69.
461. Datar R, Orenga S, Pogorelcnik R, Rochas O, Simner PJ, van Belkum A. Recent Advances in Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin Chem.* 2021;68(1):91-8.
462. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003;24(1):59-66.
463. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005;84(4):833-42.
464. Tímermans A, Vázquez R, Otero F, Gosálvez J, Johnston S, Fernández JL. DNA fragmentation of human spermatozoa: Simple assessment of single- and double-strand DNA breaks and their respective dynamic behavioral response. *Andrology.* 2020;8(5):1287-303.
465. Fernández JL, Cartelle M, Muriel L, Santiso R, Tamayo M, Goyanes V, et al. DNA fragmentation in microorganisms assessed *in situ*. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(19):5925-33.
466. Tamayo M, Santiso R, Gosálvez J, Bou G, Fernández JL. Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an *in situ* DNA fragmentation assay. *BMC Microbiol.* 2009;9:69.
467. Santiso R, Tamayo M, Fernández JL, del Carmen Fernández M, Molina F, Villanueva R, et al. Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2009;47(8):2593-5.
468. Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Bou G, Fernández M del C, Fernández JL. A rapid *in situ* procedure for determination of bacterial susceptibility or resistance to antibiotics that inhibit peptidoglycan biosynthesis. *BMC Microbiol.* 2011;11:191.

469. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. [Internet]. 2014 [citado 25 de marzo de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
470. Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2002;122(1):262-8.
471. Kollef KE, Schramm GE, Wills AR, Reichley RM, Micek ST, Kollef MH. Predictors of 30-day mortality and hospital costs in patients with ventilator-associated pneumonia attributed to potentially antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *Chest*. 2008;134(2):281-7.
472. Falagas ME, Kasiakou SK, Rafailidis PI, Zouglikis G, Morfou P. Comparison of mortality of patients with *Acinetobacter baumannii* bacteraemia receiving appropriate and inappropriate empirical therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(6):1251-4.
473. Falagas ME, Bliziotis IA. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(6):630-6.
474. Chen FJ, Lo HJ. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36(1):1-9.
475. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998;351(9105):797-9.
476. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 2006;12(1):83-8.
477. Bou G, Otero FM, Santiso R, Tamayo M, Fernández M del C, Tomás M, et al. Fast assessment of resistance to carbapenems and ciprofloxacin of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(11):3609-13.

478. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement M100-S24, vol 34. 1st ed. Wayne, PA. CLSI publication; 2014.
479. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Marcos A, Jimenez de Anta T. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(5):1201-3.
480. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39(6):757-62.
481. Wisplinghoff H, Decker M, Haefs C, Krut O, Plum G, Seifert H. Mutations in *gyrA* and *parC* associated with resistance to fluoroquinolones in epidemiologically defined clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(1):177-80.
482. Cartelle M, del Mar Tomas M, Pertega S, Beceiro A, Dominguez MA, Velasco D, *et al.* Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4242-9.
483. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-second informational supplement M100-S22. Vol32, no.3. Wayne, PA. CLSI publication; 2012.
484. Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1556-61.
485. del Mar Tomás M, Beceiro A, Pérez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, *et al.* Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(12):5172-5.

486. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, *et al.* OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2724-7.
487. Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A, Thomson JM, Adams MD, Goglin K, *et al.* Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1436-42.
488. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):449-65.
489. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22(6):535-43.
490. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(6):1206-15.
491. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet.* 1997;349(9049):418-22.
492. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother.* 1999;33(9):960-7.
493. Hermsen ED, Sullivan CJ, Rotschafer JC. Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am.* 2003;17(3):545-62.
494. Abraham N, Kwon DH. A single amino acid substitution in PmrB is associated with polymyxin B resistance in clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;298(2):249-54.
495. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, *et al.* Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3628-34.
496. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, *et al.* Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated

- by the *pmrAB* two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3370-9.
497. Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 2004;186(13):4124-33.
498. Nummila K, Kilpeläinen I, Zähringer U, Vaara M, Helander IM. Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Mol Microbiol.* 1995;16(2):271-8.
499. Trent MS, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR. An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem.* 2001;276(46):43122-31.
500. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(5):1163-7.
501. Park YK, Jung SI, Park KH, Cheong HS, Peck KR, Song JH, et al. Independent emergence of colistin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64(1):43-51.
502. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(1):29-40.
503. Fernández-Reyes M, Rodríguez-Falcón M, Chiva C, Pachón J, Andreu D, Rivas L. The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective. *Proteomics.* 2009;9(6):1632-45.
504. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):4971-7.

505. Soon RL, Nation RL, Cockram S, Moffatt JH, Harper M, Adler B, *et al.* Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(1):126-33.
506. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* 2007;130(5):797-810.
507. Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(12):2710-7.
508. Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1415-8.
509. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid *in vitro* susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol.* 1994;32(7):1757-62.
510. Trenholme GM, Kaplan RL, Karakusis PH, Stine T, Fuhrer J, Landau W, *et al.* Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. *J Clin Microbiol.* 1989;27(6):1342-5.
511. Luna CM, Aruj P, Niederman MS, Garzón J, Violi D, Prignoni A, *et al.* Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J.* 2006;27(1):158-64.
512. Spellberg B, Bartlett JG, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance. *N Engl J Med.* 2013;368(4):299-302.
513. Radman M. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* 1975;5A:355-67.
514. Justice SS, Hunstad DA, Seed PC, Hultgren SJ. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(52):19884-9.

515. Pine L, Boone CJ. Comparative cell wall analyses of morphological forms within the genus *Actinomyces*. J Bacteriol. 1967;94(4):875-83.
516. Justice SS, Hunstad DA, Cegelski L, Hultgren SJ. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. Nat Rev Microbiol. 2008;6(2):162-8.
517. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement M100-S23. Wayne, PA. CLSI publication; 2013.
518. Rolinson GN. Effect of beta-lactam antibiotics on bacterial cell growth rate. J Gen Microbiol. 1980;120(2):317-23.
519. Ryan DM, Monsey D. Bacterial filamentation and in vivo efficacy: a comparison of several cephalosporins. J Antimicrob Chemother. 1981;7(1):57-63.
520. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. Science. 2004;305(5690):1629-31.
521. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. FEMS Microbiol Rev. 2008;32(2):361-85.
522. Blázquez J, Gómez-Gómez JM, Oliver A, Juan C, Kapur V, Martín S. PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 2006;62(1):84-99.
523. Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, et al. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. PLoS Pathog. 2009;5(3):e1000353.
524. Lagacé-Wiens P, Walkty A, Karlowsky JA. Ceftazidime-avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections. Core Evid. 2014;9:13-25.

525. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*. 2012;3(5):421-33.
526. Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, Rousset-Delvallez M, Jones RN. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*. 2001;32 Suppl 2:S81-93.
527. Tuomanen E, Tomasz A. Mechanism of phenotypic tolerance of nongrowing *Pneumococci* to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1990;74:102-12.
528. Laible NJ, Germaine GR. Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun*. 1985;48(3):720-8.
529. Wichgers Schreur PJ, van Weeghel C, Rebel JM, Smits MA, van Putten JPM, Smith HE. Lysozyme resistance in *Streptococcus suis* is highly variable and multifactorial. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e36281.
530. Ohno N, Yadomae T, Miyazaki T. Enhancement of autolysis of *Streptococcus pneumoniae* by lysozyme. *Microbiol Immunol*. 1982;26(4):347-52.
531. Cottagnoud P, Tomasz A. Triggering of pneumococcal autolysis by lysozyme. *J Infect Dis*. 1993;167(3):684-90.
532. Leclercq R. Macrolides, lincosamides, and strepto gramins. En Courvalin P, Leclercq R, Rice L. *Antibiogram*. Portland, OR: ESKA; 2010 p. 305-326.
533. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(2):232-260.
534. Pfeffer JM, Strating H, Weadge JT, Clarke AJ. Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J Bacteriol*. 2006;188(3):902-8.

535. Hermann T. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(14):1841-52.
536. Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP. The current state of multidrug-resistant Gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy.* 2008;28(2):235-49.
537. Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(4):611-4.
538. Seputiene V, Povilonis J, Armalyte J, Suziedelis K, Pavilionis A, Suziedeliene E. Tigecycline - how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? *Medicina (Kaunas).* 2010;46(4):240-8.
539. Osei Sekyere J, Govinden U, Bester LA, Essack SY. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. *J Appl Microbiol.* 2016;121(3):601-17.
540. Otero F, Santiso R, Tamayo M, Fernández JL, Bou G, Lepe JA, *et al.* Rapid Detection of Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria Through Assessment of Changes in Cellular Morphology. *Microb Drug Resist.* 2017;23(2):157-62.
541. Tomasz M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol.* 1995;2(9):575-9.
542. Tomasz M, Palom Y. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol Ther.* 1997;76(1-3):73-87.
543. Žgur-Bertok D. DNA damage repair and bacterial pathogens. *PLoS Pathog.* 2013;9(11):e1003711.
544. Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(6):1126-45.
545. Huisman O, D'Ari R, Gottesman S. Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81(14):4490-4.

546. Margolin W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(11):862-71.
547. Chen Y, Milam SL, Erickson HP. SulA inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. *Biochemistry.* 2012;51(14):3100-9.
548. Hill TM, Sharma B, Valjavec-Gratian M, Smith J. sfi-independent filamentation in *Escherichia coli* Is *lexA* dependent and requires DNA damage for induction. *J Bacteriol.* 1997;179(6):1931-9.
549. Otero F, Tamayo M, Santiso R, Gosálvez J, Bou G, Fernández JL. Rapid Assessment of Resistance to Antibiotic Inhibitors of Protein Synthesis in the Gram-Positive Pathogens, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pneumoniae*, Based on Evaluation of the Lytic Response. *Microb Drug Resist.* 2017;23(3):267-71.
550. Suzuki H, Kilgore WW. Effects of mitomycin C on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1967;93(2):675-82.
551. Gunderson CW, Segall AM. DNA repair, a novel antibacterial target: Holliday junction-trapping peptides induce DNA damage and chromosome segregation defects. *Mol Microbiol.* 2006;59(4):1129-48.
552. Boberek JM, Stach J, Good L. Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine. *PLoS ONE.* 2010;5(10):e13745.
553. Norton MD, Spilikia AJ, Godoy VG. Antibiotic resistance acquired through a DNA damage-inducible response in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2013;195(6):1335-45.
554. Cambridge J, Blinkova A, Magnan D, Bates D, Walker JR. A replication-inhibited unsegregated nucleoid at mid-cell blocks Z-ring formation and cell division independently of SOS and the SlmA nucleoid occlusion protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2014;196(1):36-49.
555. Moazed D, Noller HF. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature.* 1987;327(6121):389-94.

556. Feldman MB, Terry DS, Altman RB, Blanchard SC. Aminoglycoside activity observed on single pre-translocation ribosome complexes. *Nat Chem Biol.* 2010;6(1):54-62.
557. Scheunemann AE, Graham WD, Vendeix FAP, Agris PF. Binding of aminoglycoside antibiotics to helix 69 of 23S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(9):3094-105.
558. Vicens Q, Westhof E. Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: an analysis of X-ray crystal structures. *Biopolymers.* 2003;70(1):42-57.
559. Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, Rush TS, O'Connell J, Bradford PA. Functional, Biophysical, and Structural Bases for Antibacterial Activity of Tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006;50(6):2156-66.

