



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Determinación de perfiles de resistencia a antibióticos  
de bacterias aisladas del Golfo de México**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**Javier Castañeda Díaz**

**CODIRECTORES:**

**M. en C. Luis Emmanuel Romero González**

**Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán**

**Cuernavaca Morelos**

**2022**

## Lugar de realización

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular, Laboratorio de Investigación en Programas Institucionales número 3 (LinPI 3), Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del M.C. Luis Emmanuel Romero González y del Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán.

Este estudio fue financiado con el donativo CONACYT-Problemas Nacionales no. 2017-01-5182, con los recursos para mi proyecto de investigación y una beca de 6 meses para mí.

# Agradecimientos

A mis padres, por apoyarme y motivarme a cumplir todas mis metas, por enseñarme a ser una persona responsable, trabajadora y sobre todo honesta y por todo su esfuerzo, sacrificio y tiempo que me dieron.

A mi familia, hermano, amigos y profesores que estuvieron conmigo apoyándome y motivándome a ser mejor persona, así como a trabajar con empeño y esforzarme ante cualquier situación.

A cielo, quien con su cariño y paciencia me apoyó y motivó a seguir adelante todos estos años de carrera. Por mostrarme que con el esfuerzo, perseverancia y paciencia todo es posible y por llenar mi vida de felicidad y amor.

Al Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán, porque gracias a usted que me abrió las puertas de su laboratorio, pude finalizar mi formación de licenciatura, así como obtener experiencia en el trabajo individual y colectivo dentro y fuera del laboratorio y con ello ser una mejor persona cada día.

Al M.C. Luis Emmanuel Romero González, que desde que llegué el primer día al laboratorio, me ensañaste a ser más responsable, crítico y observador con todos los experimentos y aspectos del trabajo, gracias a ti que estuviste todos estos años enseñándome a trabajar en equipo y supervisándome pude finalizar mi proyecto de licenciatura y ser un mejor estudiante.

Índice	
I.Introducción.....	8
Historia de los antibióticos.....	8
Problemática actual de la resistencia a antimicrobianos.....	9
Resistencia a antibióticos en ambientes naturales.....	12
Mecanismos de acción de antibióticos.....	15
Mecanismos de resistencia bacteriana.....	21
Factores que contribuyen a la proliferación de la resistencia bacteriana.....	25
Medidas implementadas para el desarrollo de soluciones contra la problemática de la resistencia a antibióticos.....	27
II.Antecedentes.....	30
III. Justificación:.....	33
IV. Hipótesis:.....	34
V. Objetivo.....	35
Objetivo general:.....	35
Objetivos específicos:.....	35
VI. Materiales y Métodos:.....	36
Diagrama general de trabajo.....	36
Cepas utilizadas en el proyecto de investigación.....	36
Medios y condiciones de cultivo utilizados.....	37
Preparación de los inóculos.....	38
Cuantificación de la producción de piocianina.....	38
Antibióticos utilizados.....	39
Preparación de antibióticos.....	39
Determinación de susceptibilidad a antibióticos por método de microdilución en placa.....	40
Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cepas seleccionadas.....	42
Extracción de DNA genómico de cepas seleccionadas.....	44
Oligonucleótidos utilizados en el proyecto de investigación.....	45
Identificación de las cepas seleccionadas por secuenciación de rRNA 16S.....	45
VII.Resultados.....	47
Caracterización de los perfiles de resistencia por método de microdilución en placa.....	47
Selección de cepas del GoM con perfiles de resistencia relevantes.....	50
Caracterización parcial de cepas de <i>Pseudomonas</i> aisladas del GoM.....	52
Determinación de la concentración mínima inhibitoria de distintos antibióticos en cepas del GoM.....	55
Identificación taxonómica de aislados del GoM mediante secuenciación del gen rRNA 16S.....	63
VIII.Discusión.....	66
IX.Conclusiones.....	74
X.Perspectivas.....	75
XI.Referencias.....	76

## Abreviaturas y siglas

- BMR**: Bacterias Multi-Resistentes
- CAMHB**: “Cation Adjusted Müeller-Hinton Broth”
- CIGoM**: Consorcio de Investigación del Golfo de México
- CDC**: “Centers for Disease Control and Prevention”
- CLSI**: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
- EUA**: Estados Unidos de América
- FDA**: Administración de alimentos y medicamentos de América
- GoM**: Golfo de México
- HGT**: Transferencia horizontal de genes
- MH**: Mueller Hinton
- IDSA**: “Infectious Diseases Society of America”
- LB**: “Lysogeny Broth”
- MRSA**: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- MIC**: Concentración mínima inhibitoria
- OMS**: Organización Mundial de la Salud
- PCR**: “Polymerase Chain Reaction”
- PBP**: Proteínas de unión a penicilinas
- PABA**: Ácido paraaminobenzoico
- PUCRA**: Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana
- RAM**: Resistencia a los antimicrobianos
- UFC**: Unidades Formadoras de Colonias
- UNAM**: Universidad Nacional Autónoma de México
- Atb**: Antibiótico

## Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama general de trabajo .....	36
Figura 2. Ensayo para la determinación inicial de resistencia .....	41
Figura 3. Ensayo de determinación de MIC .....	43
Figura 4. Cepas bacterianas que presentan resistencia a antibióticos .....	48
Figura 5. Cepas resistentes a uno o más antibióticos .....	49
Figura 6. Perfiles de resistencia a antibióticos que presentan las cepas bacterianas aisladas del Golfo de México.....	51
Figura 7. Aislamiento de cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. y <i>P. aeruginosa</i> .....	53
Figura 8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cepas de <i>Pseudomonas</i> aisladas del GoM.....	56
Figura .9. Concentración mínima inhibitoria de cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de ambientes clínicos .....	58
Figura.10. Ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) con el antibiótico colistina .....	60
Figura .11. Ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) con el antibiótico vancomicina .....	61
Figura.12. Ensayo de concentración mínima inhibitoria utilizando antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	62
Fig. 13. Amplificación del gen <i>rRNA</i> 16S de las cepas GM9 y GM11.....	64
Fig.14. Identificación taxonómica de los aislados GM11 y GM9.....	65

## Índice de Tablas

Tabla 1. Mecanismo de acción de los antibióticos utilizados en este proyecto .....	16
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la caracterización de cepas aisladas.....	45
Tabla 3. Cuantificación de la producción de picianina .....	54

# I. Introducción

## Historia de los antibióticos

El mundo de los microorganismos empezó a ser descubierto en el siglo XVII con ayuda de varios pioneros en el mundo de la microbiología, como Robert Hooke, quien es particularmente reconocido por sus observaciones utilizando un microscopio, y Anton Van Leeuwenhoek, quien observó las primeras bacterias, marcando el inicio para el estudio de organismos microscópicos (Madigan et al., 2015).

Dos siglos más tarde, Koch y Pasteur describieron independientemente la teoría microbiana, la cual evidenciaba que las enfermedades infecciosas eran causadas por microorganismos patógenos. Estos descubrimientos permitieron el desarrollo de vacunas y la identificación de bacterias causantes de enfermedades, como el cólera y la tuberculosis, que presentaban una alta mortalidad entre las poblaciones humanas (Lederberg, 2000).

En 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina por una serie de eventos al azar que dieron origen al descubrimiento de un antibiótico revolucionario. Fleming trabajaba con cepas de *Staphylococcus aureus*, mientras que en el laboratorio vecino realizaban estudios sobre el hongo *Penicillium notatum*. Por serendipia las esporas de este hongo fueron a parar en las cajas de cultivo de Fleming, quien observó el efecto inhibitorio generado por el desarrollo del hongo en el crecimiento bacteriano. Años más tarde, el compuesto causante de dicha inhibición, llamado penicilina, se purificó gracias a los científicos Howard Florey y Ernst Boris Chain (Acuña-Leiva, 2002).

En los siguientes años, Fleming y sus colaboradores propusieron a la penicilina como un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas (Sengupta et al., 2013) y la implementación de la penicilina fue clave para tratar las infecciones producidas por bacterias; sin embargo, desde ese momento Fleming advirtió que el uso excesivo de estos tipos de compuestos llevarían al mundo a una era post-antibiótica (Ventola, 2015).

El uso de antibióticos como la penicilina, estreptomycin, cloranfenicol y una lista creciente, prometían erradicar enfermedades infecciosas, esta situación llevó a que se les nombraron “medicamentos maravillosos” (Lederberg, 2000).

Sin embargo, a pesar de que el primer antibiótico fue prescrito en el año de 1940, solo tres años después se presentaría el primer caso mundial de una cepa de *Staphylococcus* resistente a penicilina, esto marcaría el inicio de una carrera para encontrar nuevos fármacos antimicrobianos que ayudarían a combatir patógenos bacterianos (*Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, 2019).

De manera natural, bacterias, hongos y plantas pueden producir compuestos en bajas cantidades como parte del metabolismo secundario, estas moléculas pueden tener diversas funciones, entre las que se ha determinado la actividad antimicrobiana. La producción de estos compuestos y la actividad antagónica que ejercen sobre microorganismos pueden verse afectados por factores tanto genéticos como ambientales (Davies, 2009).

Muchos de los compuestos metabólicos con actividad antimicrobiana producidos por microorganismos han sido modificados por el humano para volverlos más estables, fáciles de sintetizar y específicos (Kummerer, 2004). Debido a que la utilización de estos compuestos se volvió una práctica común, Selman Waksman acuñó la palabra antibiótico en 1941, definiendo a estas moléculas como: "sustancias químicas producidas por microorganismos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias e incluso causar su muerte" (Sengupta et al., 2013).

Alrededor del 75% de los antibióticos comerciales se han aislado a partir de actinobacterias, principalmente de las pertenecientes al género *Streptomyces* que se encuentran en el suelo. Por otro lado, alrededor del 12% de antibióticos provienen de bacterias diferentes a *Streptomyces*, lo que sugiere que aún existen fuentes potenciales alternativas para encontrar compuestos antimicrobianos producidos por géneros bacterianos ignorados anteriormente (Martens & Demain, 2017).

A lo largo de los años, la búsqueda e identificación de estos compuestos antibacterianos producidos por microorganismos, ha permitido estudiar el fenómeno de inhibición que exhiben. Este fenómeno se apoya en diferentes mecanismos, los cuales permiten inhibir, alterar y/o bloquear estructuras o funciones fisiológicas primordiales de las bacterias.

### **Problemática actual de la resistencia a antimicrobianos**

Desde hace varios años existe una gran preocupación por la aparición de bacterias multi-resistentes a antibióticos (BMR), este tipo de bacterias se definen como aquellas que no son susceptibles a al menos un agente antimicrobiano de tres o más categorías diferentes (Magiorakos et al., 2012).

Estos compuestos antibacterianos se utilizan en grandes cantidades para diversos objetivos, desde el tratamiento de enfermedades infecciosas, hasta su utilización como factores de crecimiento en animales de granja. Lamentablemente, el uso de estos agentes ha estado acompañado por la rápida aparición de cepas resistentes y con ello un aumento en las hospitalizaciones, así como en los niveles de mortalidad en pacientes. En el informe del CDC de 2019 se reportan infecciones por bacterias resistentes a antibióticos en al menos 2.8 millones de personas cada año en los Estados Unidos, de los cuales mueren alrededor de 35,000 personas como resultado directo de estas infecciones (CDC, 2019). Otro hecho que agrava esta crisis mundial de resistencia, es el consumo de antibióticos en humanos, el cual se ha incrementado en un 40% entre el año 2000 y el 2010 mundialmente. Esta situación empeora por el contrabando de grandes cantidades de antibióticos, la mala calidad de fabricación de estos y la falta de leyes que regulen la manera en que se consumen y comercian estos productos, favoreciendo su uso inadecuado y por consecuencia la aparición de resistencia bacteriana (Neill, 2014).

Aunado a esto, actualmente la crisis generada por la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2 está requiriendo una mayor atención por parte de los sistemas de salud a nivel mundial, lo que ha ocasionado que otras crisis de salud pública como la RAM (resistencia a antimicrobianos) pierdan relevancia. Esta problemática de la RAM se agravó debido a la utilización de antibióticos de manera empírica en los centros de salud, para el tratamiento de infecciones respiratorias las cuales podrían ser causadas por bacterias patógenas o por el virus SARS-CoV-2. La pandemia también ha interrumpido las prácticas rutinarias de control de infecciones y durante los años 2020 y 2021, la atención se ha centrado en el diagnóstico de SARS-CoV-2 y no en la identificación y/o aislamiento de bacterias BMR. Por otra parte, el esfuerzo por parte de compañías farmacéuticas en el desarrollo de nuevos tratamientos se centró en la compuestos para combatir la infección por SARS-CoV-2, mientras que el desarrollo y búsqueda de nuevos antibióticos para combatir bacterias patógenas ha disminuido lo cual podría tener consecuencias inesperadas en la lucha contra la RAM (Ghosh et al., 2021).

Por otra parte, se ha demostrado que la aparición de cepas BMR ha causado problemas perjudiciales a la salud de los seres humanos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Datos existentes de la CDC muestran que, en el 2017 en EUA, bacterias como *Acinetobacter baumannii* y *Clostridium difficile* estuvieron relacionadas con la muerte de alrededor de 12,800 personas al año, mientras que *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas aeruginosa* mataron alrededor de 2,700

personas al año. Estos datos son parte de una lista interminable que demuestran los daños ocasionados por cepas BMR (CDC, 2019).

De seguir con la tendencia actual en el uso de antibióticos los expertos afirman que podríamos presenciar un escenario similar a una era pre-antibiótica (Davies & Davies, 2010) y que para el 2050 las BMR matarán más de 10 millones de personas al año (Neill, 2014). Estos pronósticos se agravaron en los últimos años, ya que, durante las últimas 2 décadas, las infecciones virales del tracto respiratorio han contribuido significativamente a la mortalidad tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo y, en la mayoría de los casos, las muertes no son el resultado del daño causado por los virus, más bien, en la mayoría de los casos las muertes están asociadas con infecciones bacterianas secundarias. Por ejemplo, de los 4 millones de muertes al 10 de julio del 2021 relacionadas a infecciones por el virus SARS-CoV-2, el 30% de estas posiblemente han sido causadas por infecciones bacterianas secundarias resistentes a antibióticos (Adebisi et al., 2021).

Por otro lado, la resistencia no solo es una preocupación importante para las instituciones mundiales de la salud, sino que también tiene repercusiones económicas para los diferentes países. Las infecciones relacionadas a bacterias resistentes implican un mayor tiempo de hospitalización y un mayor costo del tratamiento. En la Unión Europea se invierten al año 1,5 millones de € para poder tratar infecciones por bacterias patógenas que se ven agravadas debido a la resistencia a antibióticos (Roberts et al., 2009). En los países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), se calcula un coste adicional de 10.000-40.000 \$ para el tratamiento de un paciente infectado por bacterias resistentes a antibióticos (Klevens et al., 2007).

Debido a la problemática generada por estas bacterias BMR en los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) dio a conocer una lista que presenta las bacterias que necesitan urgentemente el desarrollo de nuevos tratamientos capaces de combatir infecciones ocasionadas por las mismas. Esta lista clasifica a las bacterias en tres grupos de prioridad diferentes: crítica, elevada y media. Dentro de estos niveles destacan géneros como *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y algunas Enterobacterias como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia* y *Proteus*, las cuales están relacionadas con infecciones graves en centros hospitalarios, residencias de ancianos y pacientes inmunocomprometidos (OMS, 2017).

De igual forma, la OMS dio a conocer una lista donde se muestran los diferentes antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones en humanos, los cuales están clasificados en tres grupos en función de su importancia. Destacan los antibióticos de familias como cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, cetólidos, polimixinas y quinolonas, que en su mayoría ya no tienen actividad contra bacterias patógenas. El objetivo de esta lista es dar a conocer entre los académicos, médicos e instituciones gubernamentales los principales grupos de bacterias que están siendo imposibles de tratar con los medicamentos actuales, y que están generando un problema crítico para tratar enfermedades infecciosas (OMS, 2017). En este proyecto utilizaremos esta lista de antibióticos para estudiar la resistencia de las bacterias en estudio.

### **Resistencia a antibióticos en ambientes naturales**

En la naturaleza, las bacterias están en constante competencia en los nichos ecológicos que habitan, desarrollando mecanismos de ataque y defensa. Uno de estos mecanismos es la producción de compuestos con actividad antagónica y en consecuencia se desarrollan mecanismos de resistencia a estos compuestos, otorgándole mayores probabilidades de sobrevivir a los microorganismos mejor adaptados (Martínez, 2008).

A pesar de que este fenómeno de competencia se relaciona principalmente con el uso clínico de los antibióticos, este tipo de moléculas pueden tener otro tipo de funciones en el nicho ecológico, como moléculas implicadas en la señalización celular, regulación de su metabolismo, cambios transcripcionales e incluso como fuentes de carbono (Perry et al., 2016). Además, la síntesis y difusión de compuestos antibióticos en ambientes naturales sugiere que una gran cantidad de bacterias en ambientes naturales y bacterias en ambientes clínicos han estado en contacto con este tipo de moléculas en un mismo nicho, y por esta razón existe la posibilidad de que estas bacterias hayan generado una amplia variedad de mecanismos de resistencia a los mismos como consecuencia de esta exposición (Marti et al., 2014).

En ese sentido, se ha postulado que los antibióticos y sus rutas biosintéticas han evolucionado desde hace millones de años, permitiendo a las bacterias sobrevivir en ambientes hostiles, además de otras funciones ecológicas que pueden tener. Sumado a esto, diversas técnicas moleculares como los análisis metagenómicos funcionales, han revelado la presencia de determinantes de resistencia en ambientes naturales prístinos, estos determinantes de resistencia no sólo pueden ser proteínas codificadas por genes, sino también mutaciones en regiones reguladoras, que no necesariamente

codifican a proteínas (Martínez, 2008). Esto sugiere que la resistencia es un fenómeno tan antiguo como la producción de los antibióticos y que existen en el ambiente mucho antes de la presión de selección generada por la introducción o contaminación por antibióticos utilizados en la industria de la salud (Allen et al., 2010).

De la misma forma, a pesar de que en ambientes naturales existe una gran cantidad de moléculas antimicrobianas con la capacidad de generar resistencia en las bacterias, se sabe que la introducción de compuestos antibióticos de uso clínico genera una presión de selección adicional y con ello la aceleración del fenómeno de la resistencia bacteriana (Davies & Davies, 2010). Sin embargo, esta presión de selección generada por los antibióticos no parece ser el origen del fenómeno de resistencia, sino más bien un factor que incrementa la proliferación de cepas resistentes (Dantas & Sommer, 2012). Por ende, todo parece indicar que los mecanismos de resistencia tienen un origen ambiental que posteriormente mejora por la presión de selección generada por compuestos antibióticos en nichos específicos como la clínica o las granjas (Marti et al., 2014; Hiltunen et al. 2017).

Además, se sabe que el medio ambiente es una gran fuente de nuevos genes de resistencia, a la cual pueden acceder diversas familias y géneros bacterianos presentes en una comunidad bacteriana (Davies, 2009). A este conjunto de genes de resistencia de bacterias ambientales y patógenas presentes en un nicho determinado se le define como resistoma. El resistoma es importante porque está constituido por un reservorio de determinantes de resistencia que puede ser movilizados entre bacterias patógenas y ambientales, aportando una nueva variedad de material genético capaz de generar resistencia a antibióticos (Cox & Wright, 2013). En ese sentido, las bacterias pueden acceder a nuevos determinantes de resistencia gracias a la presencia del resistoma y a la capacidad de movilizar estos genes de resistencia mediante transferencia horizontal de genes (HGT) (Perry et al., 2016).

No obstante, Hiltunen et al. (2017) señalan que los genes presentes en el resistoma, no necesariamente están relacionados con la codificación de un mecanismo de resistencia a antimicrobianos, ya que este gen originalmente podría tener otras funciones en la bacteria donadora (señalización, metabolismo, etc) pero no dentro de la bacteria que adquiera ese gen. Un ejemplo sobre esta hipótesis es la presencia de genes CTX-M que codifican betalactamasas de clase A según la clasificación de Ambler. Estos genes fueron encontrados en un hospedero ambiental del género *Kluyveria* (posiblemente el hospedero nativo del gen) donde no se pudo identificar ninguna función

asociada a resistencia a betalactámicos, sin embargo, en bacterias patógenas que codifican este tipo de betalactamasas el gen CTX-M le otorga una ventaja frente a un antibiótico betalactámico. Es posible que estas bacterias hayan podido acceder a dicho gen gracias al resistoma existente en diversos ambientes (Dantas & Sommer, 2012). Por lo tanto, la importancia del resistoma recae en la aportación de determinantes de resistencia que bajo condiciones apropiadas pueden generar resistencia a ciertos antibióticos y con ello la posibilidad de que estos genes puedan transferirse en diversas bacterias patógenas, lo que puede ocasionar un problema para el tratamiento de infecciones.

Por otro lado, se sabe que la toxicidad de una molécula antibiótica depende de la concentración a la que se encuentre, la mayoría de las veces los antibióticos se suministran en concentraciones elevadas, principalmente en ambientes clínicos para poder eliminar las infecciones bacterianas. Sin embargo, en ambientes naturales las concentraciones no son tan elevadas, se han realizado diversos estudios en los que se demuestra la presencia de concentraciones sub-inhedorias de antibióticos en ambientes naturales como suelos, lagos y mares (D'Costa et al. 2011; Hong et al., 2018). Davies & Davies, (2010) señalan que, en ambientes naturales, las concentraciones sub-inhedorias de compuestos con actividad antimicrobiana favorecen la permanencia de genes de resistencia en las bacterias debido a la constante presencia de dichos compuestos. Lo anterior sugiere que la generación de resistencia no está relacionada con la concentración de los antibióticos, si no con las características propias del nicho en el que se encuentren las bacterias. Con esto se podría explicar que en diversos estudios se han encontrado bacterias resistentes a antibióticos en lugares donde la actividad antropogénica es nula.

Un ejemplo de esto es la presencia de resistencia a antibióticos en ambientes naturales como la reportada por D'Costa et al. (2011), quienes demostraron mediante análisis metagenómicos la presencia de bacterias como *Aeromicrobium* spp, *Arthrobacter* spp y *Frankia* spp que contenían genes de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina y glucopéptidos (*vanX*, *vanH*, *vanA*), en muestras de sedimentos pertenecientes a especies de animales y vegetales exclusivas del pleistoceno que fueron tomadas del permafrost; una capa de suelo congelado que no permanece cubierto de hielo.

Otro estudio que demuestra la presencia de genes de resistencia antiguos o con un origen anterior a la introducción de antibióticos en la salud humana, es lo reportado por Bhullar et al., (2012). El estudio realizado por estos autores permitió aislar diversas cepas bacterianas de una cueva en las que se pudo identificar la presencia de enzimas macrólido quinasas y daptomicina hidrolasas, las cuales los autores atribuyen a un origen evolutivo.

Estos estudios demuestran que la resistencia a antibióticos en algunos casos existe incluso antes de la introducción de estos compuestos y que puede estar presente en ambientes que han estado aislados de actividad antropogénica. Por lo que diversos autores sugieren que microorganismos patógenos, no patógenos, productores y no productores de antibióticos en ambientes naturales, podrían ser un reservorio de genes de resistencia a antibióticos y que estos genes tendrían el potencial de ser transferidos a bacterias patógenas bajo condiciones apropiadas, generando un riesgo potencial para la salud (Bhullar et al., 2012; Marti et al., 2014).

Es por ello que realizar investigaciones sobre el rol ecológico de la resistencia es importante, porque esto ayudaría a entender como las bacterias generan esta resistencia y en qué circunstancias pueden expresar y transferir estos determinantes de resistencia. Muchos de estos genes aún no se han identificado y la aparición de estos podría causar un grave problema en un futuro próximo si se llegaran a movilizar hacia bacterias de importancia clínica (Dantas & Sommer, 2012).

### **Mecanismos de acción de antibióticos**

Para hablar sobre el mecanismo de acción de los antibióticos tenemos que especificar que estos se clasifican en dos tipos principales según su mecanismo de acción: bactericidas y bacteriostáticos o bacteriolíticos. Los primeros se encargan de ejercer una acción letal frente a la bacteria, mientras que los bacteriostáticos inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano; sin embargo, la acción depende de las concentraciones del antimicrobiano y de los microorganismos afectados (Calvo & Martínez, 2009).

En el presente trabajo se utilizaron diversos antibióticos, tomando en cuenta la lista de la OMS mencionada anteriormente y según la importancia clínica de estos antibióticos y el grado de resistencia que presentan en diversas bacterias patógenas (OMS, 2017).

A continuación, se describirán los mecanismos de acción de los antibióticos que se utilizaron en este proyecto de investigación, según la familia a la que pertenecen y el blanco molecular en el que actúan; resumidos en la Tabla 1.

Empezaremos por describir los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana, por lo cual primero debemos de entender su estructura y las funciones esenciales que brinda.

Tabla 1. Mecanismo de acción de los antibióticos utilizados en este proyecto

Mecanismos de acción	Grupo	Categoría	Nivel de prioridad	Fármaco comercializado
-Inhibición de la síntesis de la pared celular	-Glucopéptidos		-Gran prioridad	- Clorhidrato de vancomicina
	-B-lactámicos	-Penicilinas	-Gran prioridad	-Oxacilina sódica -Piperacilina -Ampicilina
		-Cefalosporinas 3 <sup>o</sup> generación	-Máxima prioridad	-Cefoperazona sódica -Ceftazidima
		-Carbapenémicos	-Máxima prioridad	-Meropenem -Imipenem
-Alteración de la membrana citoplasmática	-Polimixinas		-Máxima prioridad	-Sulfato de colistina
-Inhibición de la síntesis proteica	-Macrolidos		-Máxima prioridad	-Eritromicina
	-Aminoglucósidos		-Gran prioridad	-Gentamicina -Kanamicina -Amikacina
	-Tetraciclinas		-Muy importantes	-Tetraciclinas
-Alteración de la estructura de los ácidos nucleicos	-Fluoroquinolonas		-Máxima prioridad	-Norfloxacino -Ciprofloxacino

\* La información de esta tabla fue recabada de: OMS, 2017; Calvo & Martínez, 2009.

La pared celular es una estructura formada por peptidoglicano que proporciona forma y rigidez a las bacterias y ayuda en el mantenimiento de la presión osmótica interna que es ejercida por componentes citoplasmáticos. La composición de la pared celular permite agrupar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram-negativas y Gram-positivas. Las bacterias Gram-negativas se caracterizan por tener una capa delgada de peptidoglicano y una membrana lipídica externa, mientras que las Gram-positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicano y no tienen una membrana lipídica externa. (Madigan et al., 2015).

El peptidoglicano es una macromolécula que se presenta en forma de red multicapa compuesta por cadenas de glicano lineales conectadas entre sí. Los componentes del peptidoglicano son fundamentales para la formación de la pared celular, esta síntesis de peptidoglicano se inicia gracias a la enzima Mur, la cual es responsable de la síntesis del ácido N-acetilmurámico; precursor del pentapéptido. Las cadenas pentapeptídicas se producen por enzimas ligasas que se encargan de adicionar los aminoácidos L-alanina-D-ácido-glutámico, así como el ácido mesodiaminopimélico D-alanina-D-alanina para las bacterias Gram negativas, mientras que en bacterias Gram positivas se adicionan los aminoácidos L-alanina, D-ácido-glutámico- L-lisina y D-alanina-D-alanina, acompañados por los precursores N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. Estos últimos se sintetizan en el citoplasma y son fundamentales para la formación de la estructura del peptidoglicano (Van Dam *et al.*, 2009).

La síntesis del peptidoglicano ocurre en cuatro etapas dentro de las bacterias y está relacionadas con diferentes estructuras. Estas estructuras incluyen al citoplasma, la membrana y el periplasma. Durante cada una de estas etapas se han identificado blancos de inhibición en los que actúan diversos antimicrobianos y que se mencionan a continuación (Nikolaidis *et al.*, 2014).

Brevemente, la primera etapa se lleva a cabo en el citoplasma y consiste en la síntesis de precursores que como resultado da origen a la formación del N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Posteriormente, en la segunda etapa los precursores son transferidos a un transportador lipídico denominado bactoprenol que está situado en la membrana citoplasmática, con ayuda de este transportador se unen unidades disacáridas con la estructura pentapéptidica resultando en la formación de cadenas peptídicas (Madigan *et al.*, 2015).

Una vez realizado este proceso, la tercera etapa consiste en la polimerización de varias unidades disacáridas donde se logra la reacción de transglucosidación; que consiste en la unión de cada unidad disacárida con su respectivo pentapéptido. En este proceso se libera el bactoprenol para que posteriormente se realice la transpeptidación; que consiste en la unión de un tercer aminoácido como D-alani-D-alanina dentro de la cadena peptídica con el fin de dar estabilidad al peptidoglicano (Blair *et al.*, 2015).

Dentro de las familias de antibióticos más relevantes que inhiben la síntesis de la pared celular de bacterias patógenas se encuentran los bacitracinas, isoxazolidinonas, fosfonopeptidos, glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos. Estos dos últimos son los que se trabajaron en el presente proyecto y por lo tanto se comentan a continuación.

El primer grupo de antibióticos que abordaremos que afectan a la pared celular son los  $\beta$ -lactámicos. Este nombre se deriva de la presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura. El sitio blanco principal de estos compuestos son las proteínas unidoras de penicilina (PBP por sus siglas en inglés), las cuales ayudan al ensamblaje de los precursores del peptidoglicano. Los  $\beta$ -lactámicos tienen una estructura similar a la D-alanil D-alanina que forman parte de la cadena peptídica del peptidoglicano, lo que hace que presenten una afinidad estable y puedan ingresar dentro de la pared celular (Kapoor, Saigal & Elongavan, 2017).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no se relacionan directamente con la inhibición de la síntesis de peptidoglicano, sino con la activación del sistema de autolisinas, que son enzimas que ayudan en la degradación del peptidoglicano que provoca la muerte de la bacteria y el detenimiento de la traspeptidación (Calvo & Martínez, 2009).

El otro grupo de antibióticos que afectan a la pared son los Glucopéptidos; sus principales representantes son la vancomicina y la teicoplanina, que se emplean en la actualidad como tratamientos de último recurso en entornos hospitalarios para infecciones de gravedad en humanos. Este grupo de antibióticos se unen al D-alanil D-alanina terminal de los precursores de peptidoglicano, impidiendo la transpeptidación y transglucosilación de las unidades de peptidoglicano. En el caso de la vancomicina, se une con gran afinidad en los aminoácidos D-alanil, D-alanina evitando la transpeptidación; asimismo, se encarga también de inhibir la transglucosilación que es la unión del pentapéptido precursor encargado del crecimiento del peptidoglicano. El mecanismo que adoptan las bacterias para contrarrestar a la vancomicina se caracteriza por la generación de precursores alternativos de peptidoglicano que pueden presentar aminoácidos como D-alanil-D-Lactosa o D-alanil-D-Serina, evitando así la unión del antimicrobiano al D-alanil-D-alanina (Nikolaidis et al., 2014).

Otra de las estructuras bacterianas de importancia es la membrana citoplasmática, que es una estructura fundamental para la formación de la pared celular, esta estructura rodea el interior de la bacteria proporcionando una barrera de soporte a los componentes celulares; ya que si esta barrera

se rompe podría causar la muerte celular de la bacteria debido a la presión osmótica. Esta membrana está formada por una bicapa lipídica que presenta fosfolípidos formados por componentes hidrofóbicos, como los ácidos grasos e hidrofílicos, entre ellos el glicerol fosfato (Madigan et al., 2015).

La principal función de la membrana es la permeabilidad selectiva, la cual ayuda en la entrada y salida de moléculas fundamentales para la supervivencia de la bacteria. El uso de antibióticos que actúan sobre esta estructura es limitado, debido a que la organización química de la membrana tanto en bacterias como en células eucariotas suele ser similar; por lo que el uso de estos antibióticos en humanos puede ocasionar efectos secundarios tóxicos (Morales Araya, 1985).

Algunos de los antibióticos que afectan la pared celular son las polimixinas. Estas moléculas presentan una carga positiva, la cual es atraída por la carga negativa de la membrana citoplasmática por medio de atracción electrostática. Existen 5 tipos distintos de polimixinas: A, B, C, D y E, pero únicamente los tipos B y E (colistina) son utilizados de manera terapéutica (Calvo & Martínez, 2009).

La colistina es un decapeptido cíclico catiónico (parte peptídica) unido a una cadena ácido graso por un enlace amida, su peso molecular es de 1750 Da; con un espectro de acción exclusivo para bacterias Gram negativas (Li et al., 2003). El mecanismo de acción consiste en la unión de la colistina por atracción electrostática a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, la cadena lateral del ácido graso con propiedades hidrofóbicas se une a los fosfolípidos de la membrana externa; específicamente al lípido A de los lipopolisacaridos de la membrana, ocasionando que la permeabilidad aumente debido a que la parte peptídica de la colistina actúa como detergente catiónico. Esto da origen a la formación de poros en la membrana y con ello un desequilibrio osmótico que causa la salida y entrada de moléculas sin ninguna regulación, provocando la lisis celular (Abushaheen et al., 2020).

Por otra parte, existen otras familias de antibióticos que se encargan de inhibir la síntesis de proteínas esenciales para la formación y funcionamiento de diversos componentes fundamentales para la vida bacteriana.

La síntesis proteica es un proceso vital que está relacionado con la transcripción y traducción. Para que se lleve a cabo la síntesis proteica tiene que pasar diversas etapas: la iniciación, elongación y terminación. Las bacterias presentan un ribosoma 70S que se divide en dos subunidades (30S y 50S) esenciales para la síntesis de proteínas. De manera general, la inhibición del proceso de síntesis de

proteínas como blanco molecular por parte de los antibióticos, es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y células eucariotas, estas últimas presentan un ribosoma 80S. Esto hace posible que los antimicrobianos actúen sobre los ribosomas bacterianos, sin tener algún efecto en las células eucarióticas y por lo tanto impidiendo la síntesis de proteínas (Paredes & Roca, 2004).

Los antibióticos seleccionados en este trabajo cuyo mecanismo de acción es afectar la síntesis de proteínas son: aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas. Los aminoglucósidos son moléculas con carga positiva que se unen a la membrana externa. Estos son obtenidos de actinomicetos del suelo o producidos semi-sintéticamente, tienen un efecto bactericida dependiente de la concentración. Los aminoglucósidos actúan en la fase de elongación de la síntesis proteica en la subunidad 30S en la región 16S, ocasionando la adición de aminoácidos erróneos dentro de la cadena peptídica, generando proteínas no funcionales o anómalas, lo que afecta la producción de proteínas estructurales y funcionales (Kapoor et al., 2017).

En el caso de las tetraciclinas, estas ingresan al citoplasma bacteriano por un proceso dependiente de energía. Una vez dentro, se unen al interior de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, actuando en la fase de iniciación, bloqueando la unión del aminoacil-RNA<sup>t</sup> en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo la síntesis de proteínas (Calvo & Martínez, 2009).

Los macrólidos se caracterizan por el bloqueo de la subunidad 30S, una vez que ingresan a la célula bacteriana interactúan en el sitio A de la subunidad 30S del ribosoma y modifican el proceso de traducción causando un emparejamiento incorrecto de RNA<sup>m</sup> y RNA<sup>t</sup>; alterando así la síntesis proteica (Abushaheem et al., 2020).

Como hemos visto, las familias de antibióticos no solo inhiben la síntesis de la pared celular o la síntesis de proteínas, también afectan otros procesos esenciales para la vida bacteriana, como la síntesis de ácidos nucleicos.

Dentro de los antibióticos capaces de inhibir la síntesis de ácidos nucleicos seleccionamos al grupo de las quinolonas, ya que es uno de los antimicrobianos de primera línea en el tratamiento de infecciones. En la división celular, el proceso de replicación del DNA es necesario para poder transmitir la información genética cuando las células proliferan. Una de las fases esenciales en este proceso es la reducción de la tensión presente en el genoma causado por el superenrollamiento del DNA. Esta

reducción se lleva a cabo por la acción de enzimas llamadas topoisomerasas encargadas de desenrollar las cadenas de DNA, produciendo cortes en la doble cadena del DNA que después serán unidos por enzimas ligasas (Calvo & Martínez, 2009).

Las quinolonas actúan bloqueando la topoisomerasa II (DNA girasa) y IV, específicamente en los dominios de medallón empalme en los aminoácidos ácido aspártico 87 y serina 83 para el caso de la topoisomerasa II, y ácido aspártico 84 y serina 80 para el caso de topoisomerasa IV, impidiendo la formación de la horquilla de replicación, ocasionando que la bacteria no pueda replicar su DNA y por lo tanto ejerce un efecto letal en la bacteria. Las fluoroquinolonas son más selectivas al dominio ligasa de la topoisomerasa IV, por lo tanto, su espectro de acción es más amplio, lo que le permite combatir infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Blair et al., 2015).

### **Mecanismos de resistencia bacteriana**

La RAM es parte de la evolución natural de las bacterias; las bacterias producen compuestos antimicrobianos para defenderse contra sus competidores, por lo que la aparición de mecanismos que permiten la supervivencia de las bacterias en presencia de estos compuestos es un fenómeno ancestral que se ha visto acelerado por el uso indiscriminado e inadecuado de antibióticos.

Los mecanismos de resistencia de bacterias pueden ser clasificados como resistencia natural o intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia intrínseca es un rasgo universal característico de un género bacteriano, particularmente se observa en mayor proporción en bacterias Gram-negativas debido a la presencia de una membrana externa y bombas de eflujo. Mientras que la resistencia adquirida puede deberse a mutaciones específicas o a la transferencia de genes, esto se abordará con mayor profundidad en los últimos párrafos de esta sección (Cecchini, Langer & Slawomirski, 2015).

Para poder comprender cómo la resistencia bacteriana en los últimos años está afectando los tratamientos con antibióticos, necesitamos entender cuáles son los diferentes mecanismos de resistencia que las bacterias utilizan para poder sobrevivir frente a los diversos ambientes en los que hay presencia de moléculas antimicrobianas.

Dentro de los mecanismos involucrados en la resistencia a antibióticos podemos nombrar cuatro principales: 1) modificación de la molécula antimicrobiana, 2) disminución de la penetración del antibiótico y/o presencia de bombas de eflujo, 3) modificación del sitio blanco y 4) procesos de transferencia de genes en las bacterias (Paredes & Roca, 2004).

La disminución en la penetración del antibiótico es un mecanismo intrínseco en bacterias Gram-negativas que se basa principalmente en la alteración de la permeabilidad de la envoltura celular, evitando que el antibiótico alcance su diana ubicada intracelular o periplasmáticamente en la bacteria. Por lo tanto, al no ser absorbidos adecuadamente, los antibióticos no llegan al blanco de acción dentro de la bacteria y no ejercen su efecto antibacteriano (Cox & Wright, 2013).

Otro de los mecanismos de resistencia intrínseca es la presencia de bombas de eflujo tanto en bacterias patógenas como ambientales, que ayuda a la expulsión de moléculas antimicrobianas. Estas bombas de flujo son complejos proteicos de transporte activo que ayudan a la expulsión de una amplia variedad de moléculas que ejercen un efecto letal en las bacterias, aunque pueden ser específicos para cada grupo de antibióticos. Se han descrito cinco principales familias de bombas de flujo: *the major facilitator superfamily*; (MFS por sus siglas en inglés), *the small multidrug resistance family* (SMR por sus siglas en inglés), *ATP-binding cassette* (ABC por sus siglas en inglés), *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE por sus siglas en inglés), *the resistance nodulation cell division family* (RND por sus siglas en inglés), siendo estas últimas las responsables en gran parte de la resistencia intrínseca de bacterias Gram-negativas (Nikolaidis et al., 2014; Kapoor et al., 2017).

Un ejemplo de las bombas de flujo RND es la codificada cromosómicamente por *Pseudomonas aeruginosa* que con ayuda del sistema de expulsión MexAB-OprM confieren resistencia intrínseca a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas. En *Escherichia coli* el sistema de expulsión AcrAB-TolC codifica bombas RND que contribuye a la resistencia intrínseca de antibióticos como las tetraciclinas, fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactámicos y macrólidos (Vignoli & Seija, 2000; Moreno et al., 2009).

Por otro lado, en el caso de la resistencia adquirida encontramos las mutaciones cromosómicas generadas por la presión de selección ejercida por compuestos antimicrobianos, lo cual puede producir la aparición de mecanismos de resistencia que afecten el sitio de acción diana de los antibióticos, causando degradaciones, inactivaciones o cambios estructurales en su sitio de acción (Kapoor et al., 2017). Como se mencionó anteriormente, la presencia constante de concentraciones sub-inhedoras de compuestos antimicrobianos producidos por bacterias ambientales puede favorecer la aparición de mutaciones espontáneas, lo cual puede beneficiar o perjudicar el crecimiento de la bacteria frente a un compuesto. Estas mutaciones pueden generar la aparición de fenotipos resistentes a antibióticos, lo que implica que las poblaciones de bacterias susceptibles al compuesto

serán eliminadas, mientras que las bacterias que hayan generado mutaciones adaptativas, les permitirán resistir concentraciones altas del antibiótico y con ello su supervivencia (Blair et al., 2015).

Aunado a esto, la diseminación de genes de resistencia en ecosistemas naturales, como los ambientes marinos, aumenta la posibilidad de la variabilidad genética y con ello la aparición de nuevos mecanismos de resistencia a diversos fármacos utilizados en la salud humana. El desemboque de aguas contaminadas con antibióticos y bacterias provenientes de ambientes hospitalarios y urbanos en ecosistemas acuáticos, podría estar generando cambios en la composición de las comunidades bacterianas autóctonas, además de generar modificaciones en las condiciones naturales (Acevedo Barrios, 2015).

La transferencia horizontal de genes (HGT) es un mecanismo eficaz para poder adquirir y movilizar material genético entre diversas especies bacterianas, lo cual genera características genotípicas y fenotípicas que permiten a las bacterias adaptarse y sobrevivir en entornos hostiles o frente a diversos microorganismos competidores (Munita & Arias, 2016).

Se ha reportado que los genes de resistencia son capaces de transferirse entre bacterias mediante elementos genéticos móviles, lo que ayudaría a las bacterias patógenas para los humanos a obtener mecanismos de resistencia del ambiente con facilidad (Moreno et al., 2009).

La adquisición de estos genes se puede dar mediante procesos de transformación, transducción y conjugación. La transformación es un mecanismo en el que material genético exógeno presente en el ambiente será incorporado y expresado por bacterias en ciertas circunstancias. La bacteria receptora presenta proteínas de unión de DNA que se encargan de ingresar este DNA a la membrana bacteriana, solo ingresa una cadena de DNA molde, la otra cadena se degrada con ayuda de enzimas nucleasas. Una vez dentro, la cadena sencilla se une a proteínas específicas que se encargan de incorporar del DNA de la bacteria donadora hacia el cromosoma de la bacteria receptora y con ello la adquisición del material genético de la bacteria donadora. La transformación ocurre de forma natural en algunas especies de bacterias, aunque también se puede efectuar por medios artificiales (Michiels et al., 2016).

En el caso de la transducción, la transferencia de material genético se realiza mediante bacteriófagos, los cuales son capaces de incorporar material genético de la bacteria que infectan. Este fenómeno sucede cuando una célula bacteriana es infectada por un fago y el virus entra en fase lisogénica (Vignoli & Seija, 2000). Durante este proceso el DNA del bacteriófago se recombina con el cromosoma

bacteriano y una vez que el fago entra en fase lítica, intervienen enzimas que actúan en el empaquetamiento del DNA vírico y con ello pueden empaquetar secciones del DNA bacteriano por accidente. De esta manera, al momento de infectar otra célula los bacteriófagos contendrán DNA bacteriano en su material genético con la capacidad de movilizar genes de una bacteria a otra (Munita & Arias, 2016).

Por último, la conjugación resulta ser el mecanismo más eficiente de transferencia de genes, la transferencia directa de la bacteria donadora a la receptora por contacto físico es apoyada por una estructura superficial especializada de funciones específicas denominada pili, esta estructura se retrae y permite el apareamiento entre células donadoras y receptoras establecido por un contacto específico (Michiels et al., 2016). La capacidad de conjugación depende de la presencia en la bacteria de plásmidos conjugativos que contienen los genes necesarios para tal proceso. Las células donadoras que presentan este contacto físico con las receptoras transfieren un plásmido, permitiendo la replicación de este material extracromosomal e incorporando material genético a la célula receptora. Generalmente, los plásmidos conjugativos solamente permiten la transferencia del material genético que tienen asociado, pero en ocasiones este plásmido puede integrarse al cromosoma bacteriano y posteriormente al momento de conjugarse se transferirá no solo a sí mismo, sino también puede arrastrar algunos genes cromosómicos cercanos al sitio donde se ha incorporado anteriormente (Vignoli & Seija, 2000; Munita & Arias, 2016).

Un claro ejemplo de HGT en ambientes naturales es lo reportado por Dantas & Sommer (2012). Dentro de su investigación destacan la adquisición de genes de resistencia *qnr* a partir de diversos patógenos bacterianos, como en el caso del aislado de *Klebsiella pneumoniae* resistente a ciprofloxacino en centros hospitalarios. Sin embargo, ellos advierten que estos genes que codifican resistencia a quinolonas pudieron llegar gracias a la transferencia horizontal a partir de bacterias marinas. Los *qnr* se han reportado en genomas de diversas familias de hospederos ambientales como *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. y *Shewanella* spp. Estas bacterias se han encontrado frecuentemente en plantas de tratamiento de aguas residuales en donde se ha reportado que existe HGT tanto en bacterias patógenas como ambientales, lo cual puede resultar en la adquisición de elementos genéticos móviles (Cox & Wright, 2013). Por todo esto, es crucial entender los mecanismos de resistencia bacteriana, así como su movilización entre diferentes especies bacterianas y entre diversos ambientes, para prevenir la aparición de nuevas cepas resistentes a antibióticos (Paredes & Roca, 2004; Michiels et al., 2016).

## **Factores que contribuyen a la proliferación de la resistencia bacteriana**

El problema de la resistencia a antibióticos es multifactorial y no está relacionado únicamente con el uso excesivo e inadecuado de antibióticos en la práctica clínica. Las industrias farmacéuticas y alimenticias, así como las instituciones gubernamentales juegan un papel crucial en la regulación y el suministro de antibióticos, tanto para animales de granja como para humanos. Ejemplo de esto es el uso excesivo de antibióticos como aditivos en el alimento de los animales en la ganadería y piscicultura, siendo un factor que podría estar contribuyendo a la selección de bacterias resistentes a diversos fármacos antimicrobianos. Por ejemplo, el 80% de los antibióticos que se venden en Estados Unidos se administra en animales de granja. Esto favorece el crecimiento animal al prevenir infecciones bacterianas que causen pérdidas económicas para el productor, ya que la administración de antibióticos, según los productores, mejora la calidad del producto animal; aunque no hay estudios contundentes al respecto (Bartlett et al., 2013).

De la misma manera, muchos de los residuos fecales de animales son utilizados como fertilizantes de cultivos frutales; además, frecuentemente los cultivos agrícolas son tratados con tetraciclinas y estreptomicinas, como si fueran pesticidas, en el sur de EUA (Levy, 2002). Cabe señalar que estos cultivos agrícolas, muchas veces son regados por aguas residuales y son consumidos directamente del campo. Este tipo de prácticas implica una vía más de diseminación de bacterias resistentes a antibióticos (Quiroz-Santiago et al., 2009).

Otro factor que contribuye al problema de la generación de resistencia son los tratamientos de antibióticos mal prescritos y usados, ya que muchas veces el paciente no cumple con el régimen indicado, o el médico receta un tratamiento erróneo al paciente (Cisneros Herreros & Peñalva Moreno, 2018). Además, muchos países carecen de programas que permitan la regularización de la compra y venta de antibióticos, por lo que la adquisición de estos medicamentos resulta ser de fácil acceso (Ventola, 2015).

La contaminación de ambientes acuáticos es otro de los factores que contribuye a agudizar este problema, ya que muchos de los antibióticos utilizados en diversas industrias circulan en estos ambientes debido al desemboque de aguas residuales provenientes de granjas, hospitales y zonas urbanas, alterando potencialmente ecosistemas microbianos. Muchos de los patógenos bacterianos de humanos y animales están presentes en residuos contaminantes que desembocan en ríos, lagunas y mares; por lo que estos ambientes constituyen un nicho de organismos patógenos potenciales que

transportan determinantes de resistencia, los cuales pueden ser dispersados mediante diferentes mecanismos de movilización. La presión de selección ejercida por los antibióticos que contaminan estos ambientes podrían favorecer la aparición de microorganismos resistentes a los antimicrobianos, pudiendo ocasionar el surgimiento de enfermedades entre poblaciones humanas y animales difíciles de tratar (Gross, 2013).

Por otro lado, el desarrollo de nuevos antibióticos por las industrias farmacéuticas ha disminuido en los últimos años. Hoy en día la producción de fármacos con actividad antibiótica está en declive debido esencialmente a los obstáculos económicos y normativos. Entre las 18 compañías farmacéuticas reconocidas en todo el mundo que se dedicaban a la investigación de nuevos fármacos antibacterianos, solamente 4 de ellas se centran en la investigación de nuevos fármacos; destacando la compañía *Novo Holdings* que ha invertido hasta \$ 16 millones de dólares en los últimos años (Plackett, 2020). Este hecho agrava el problema de la resistencia bacteriana debido a la falta de nuevos compuestos antimicrobianos.

Aunado a esto, un análisis sobre la rentabilidad de un antibiótico hecho por la Oficina de Economía de Salud en Londres, calculó que el valor neto aproximado para desarrollar un nuevo antibiótico ronda alrededor de los \$ 50 millones de dólares. En comparación, la generación de un medicamento para una enfermedad neuromuscular requiere una inversión aproximada de \$ 1 millón de dólares (Cecchini et al., 2015). El desarrollo de nuevos antibióticos suele no ser rentable para las compañías, por lo que prefieren invertir en medicamentos para el tratamiento de enfermedades crónicas como diabetes, trastornos psiquiátricos, asma, entre otros; ya que estos medicamentos se utilizan con mayor regularidad y dejan grandes ganancias para las empresas (Bartlett et al., 2013). La falta de leyes que regulen la manera en que se consumen y la irregularidad de la comercialización de estos productos favorecen el desarrollo de resistencia bacteriana a diversos antibióticos.

En el ámbito académico, la investigación sobre la resistencia bacteriana y el desarrollo de nuevos antimicrobianos también ha disminuido, debido a los recortes financieros que repercuten principalmente en las infraestructuras y equipos para el desarrollo de la ciencia en instituciones académicas. Esto se debe a la crisis económica en la que están sumergidos diversos países, afectando principalmente a los países menos desarrollados, en los cuales sus gobernantes tienen otros intereses económicos, viéndose afectada la inversión en la ciencia (Cecchini et al., 2015).

Actualmente, otro factor que ha contribuido a la RAM, es la crisis generada por la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2. El mal manejo en la administración de antibióticos por parte de las instituciones de salud durante la pandemia sumado a la falta de un diagnóstico adecuado de la neumonía atípica, ha generado un aumento en el consumo de antibióticos. Además, la aparición del SARS-CoV-2 ha ocasionado el uso indiscriminado de limpiadores y desinfectantes para prevenir la transmisión de este patógeno vírico. Esto ha provocado que las bacterias estén en constante estrés ocasionado por el efecto inhibitorio de estos compuestos antibacterianos, ejerciendo una presión de selección adicional en sus ambientes, lo cual favorece la generación de resistencia a antibióticos (Adebisi et al., 2021).

La problemática actual de la RAM puede explicarse por la suma de todos estos factores que han contribuido a la generación de BMR. Es por ello que diversas instituciones y países preocupados por la situación han empezado a realizar acciones que permitan reducir la dispersión y aparición de bacterias resistentes.

### **Medidas implementadas para el desarrollo de soluciones contra la problemática de la resistencia a antibióticos**

La resistencia antimicrobiana es una bomba de tiempo que aún podemos prevenir. Diversos países e instituciones de salud preocupados por la situación han adoptado medidas serias para el combate de la crisis mundial de resistencia bacteriana. Estas disposiciones van desde programas que benefician a las empresas farmacéuticas para el desarrollo de nuevos antibióticos, hasta campañas de difusión para prevenir el problema de la resistencia a antibióticos.

Por ejemplo, en el 2015 los Estados Unidos divulgaron un Plan de Acción Nacional para combatir a las bacterias resistentes a los antibióticos, en el que describen la necesidad de una mayor coordinación entre las agencias de salud en ese país, así como la colaboración de corporaciones en la industria farmacéutica e instituciones educativas que se dedican a la investigación (Podolsky, 2018). Otros países también han adoptado medidas para el combate de bacterias patógenas, todos ellos con enfoques individuales y variados; como en el caso de Reino Unido, el cual lanzó un programa nacional que describe la necesidad de un marco de mejoramiento en la prescripción adecuada y de la calidad de los antimicrobianos prescritos (Cecchini et al., 2015).

Con toda esta incertidumbre, en el año 2015 la OMS anunció el Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos, el cual describe cuatro ejes principales que son: 1) necesidad de mejorar los programas dirigidos a la educación sobre el uso de fármacos antimicrobianos, 2) mejorar las medidas de higiene en instituciones públicas y privadas, 3) mejor vigilancia sobre los brotes de infecciones bacterianas en diversos países y 4) reducción del uso innecesario de antimicrobianos tanto en sectores de salud humana así como agrícolas y una mayor investigación en el desarrollo de nuevos antimicrobianos (Podolsky, 2018).

En ese mismo contexto, México también ha implementado una Estrategia Nacional de Acción Contra la Resistencia a los Antimicrobianos, publicada en el Diario Oficial de la Federación (DOF). Dentro de este plan de acción se destacan tres objetivos principales para disminuir el problema de la Resistencia a los antimicrobianos: 1) el uso de antimicrobianos de manera adecuada en los sectores de salud pública humana y animal; 2) controlar, reducir y eliminar la resistencia bacteriana a los antimicrobianos; 3) accesibilidad y continuidad a tratamientos exitosos para enfermedades infecciosas causadas por bacterias. Estos objetivos están en concordancia con el Plan de Acción Mundial publicado por la OMS (Diario Oficial de la Federación, 2018).

Así mismo, entre otras estrategias aplicadas para combatir el fenómeno de la RAM y dar a conocer datos actualizados sobre infecciones causadas por patógenos bacterianos resistentes en México, se encuentra el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), publicado por la Universidad Nacional Autónoma de México en el año 2018. En este plan se plantea el intercambio de información entre diversas instituciones sobre resistencia bacteriana en el país, centros hospitalarios, centros de investigación y escuelas, con la finalidad de reunir información contundente que permita evaluar la situación nacional y plantear estrategias que ayuden a disminuir el aumento de la RAM.

El último informe del PUCRA señala que los datos para México no son prometedores, debido a que la resistencia de bacterias Gram-negativas es muy alta, destacando entre ellas bacterias como *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii* (PUCRA, 2018).

Las medidas comentadas anteriormente conllevan a contribuir con posibles soluciones al problema de la resistencia que se tiene a nivel mundial. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por mantener controles de vigilancia epidemiológicas sobre la aparición de bacterias resistentes a antibióticos a

niveles tanto hospitalarios como comunitarios, la aparición de nuevas cepas resistentes sigue en aumento (Podolsky, 2018).

La falta de estudios sobre la presencia de bacterias resistentes en ambientes naturales que han tenido poco contacto con el humano son muy escasos, ya que muchas de estas investigaciones se han realizado en ambientes nosocomiales, donde la presión de selección es acompañada por el suministro de antibióticos de manera poco regulada, lo que resulta en la aparición de patógenos resistentes (Bartlett et al., 2013).

Aunque estas investigaciones han arrojado conocimiento, aún se requiere conocer mejor el rol que juegan los antibióticos en ambientes clínicos y naturales. Para esto, es necesario realizar investigaciones en el lugar de origen de estos antimicrobianos y de genes de resistencia, es decir en ambientes naturales donde posiblemente aparecieron por primera vez. Diversos autores señalan que existen genes de resistencia que aún no se han podido identificar y permanecen en hospederos de origen ambiental que no causan ningún daño a los humanos, pero recalcan que si estos genes llegaran a transferirse hacia hospederos de importancia clínica tendríamos graves problemas para la salud del humano. Es por ello que estas investigaciones son necesarias para poder prevenir, predecir y encontrar alternativas para el combate de la resistencia bacteriana y futuros enfoques que ayudarían a evitar un problema mundial de posibles patógenos multi-resistentes.

## II. Antecedentes

Lo anterior demuestra la importancia del estudio de ambientes naturales como reservorios de genes de resistencia, particularmente el ambiente marino, que es un ecosistema donde se reporta la transmisión de determinantes de resistencia debido a factores antropogénicos y naturales (Wiese & Imhoff, 2019), los cuales están influyendo en las interacciones de diversas especies bacterianas. En ese sentido, el Golfo de México (GoM) es un mar semi-cerrado que no tiene salida al mar completamente, con una profundidad de alrededor de 4000 m en su parte central. Las mareas del GoM son ocasionadas por oscilaciones provenientes del Océano Atlántico, proporcionando al GoM una gran diversidad ambiental, inmensos humedales costeros, así como abundante materia orgánica. El GoM es de gran importancia para la economía de México, ya que presenta una gran extensión de línea costera que ofrece una gran diversidad natural y un clima tropical y subtropical para el arribo del turismo. Así mismo, presenta conexión con el Océano Atlántico por el Estrecho de Florida y el Mar Caribe por la península de Yucatán (Martínez-López & Parés-Sierra, 1998).

Anteriormente, el interés de la comunidad científica se centraba en la realización de programas de vigilancia de la resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas aisladas de procesos infecciosos en humanos o animales, pero en la actualidad, esta situación ha cambiado. Existe un enorme interés en el ámbito internacional por la realización de programas de vigilancia sobre la resistencia a antibióticos en bacterias tanto patógenas como ambientales en los más diversos ecosistemas (animal, humano y alimentario) (Podolsky, 2018). Esto con el objetivo de conocer de forma global el grado de diseminación de las bacterias resistentes y de los mecanismos de resistencia, y así poder predecir su evolución y establecer estrategias para su control.

El Consorcio de investigación del Golfo de México (CIGoM) es un consorcio que se basa en la investigación del Golfo de México, fue fundado en el año 2015 debido a la iniciativa de ideas compartidas entre investigadores e instituciones preocupadas por el impacto ambiental en el GoM. Este consorcio realiza proyectos multidisciplinarios relacionados con el impacto ambiental de la industria del gas y petróleo en el ecosistema acuático. Dentro del consorcio existen cinco líneas de investigación: plataformas de observación oceanográfica, degradación natural de hidrocarburos, escenarios de derrames, modelos de circulación y por último la línea de base y monitoreo ambiental (Consorcio de investigación del Golfo de México, 2015).

El CIGoM ha realizado estudios metagenómicos donde se analizaron sedimentos obtenidos del sudoeste del GoM, con el fin de estudiar la diversidad bacteriana en la zona. Los datos obtenidos revelaron la presencia de algunas bacterias, como son: *Burkholderia* spp, *Halomonas* spp, *Pseudomonas* spp, *Shewanella* spp y *Vibrio* spp que son patógenos oportunistas. De igual forma, se identificaron bacterias patógenas para el humano que son transmitidas a partir de alimentos, animales, transmisión sexual y centros hospitalarios, como son: *Borrelia* spp, *Ehrlichia* spp, *Leptospira* spp, *Mycobacterium* spp, *Mycoplasma* spp, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp y *Treponema* spp. (Escobedo-Hinojosa & Pardo-López, 2017). Muchos de estos géneros bacterianos se encuentran clasificados en la lista de patógenos prioritarios de la OMS y están relacionados con brotes en hospitales o centros de salud.

Como se mencionó anteriormente, los factores naturales presentes en los ambientes acuáticos, como las corrientes de agua que a su vez están acompañadas por vientos, luz del sol y calor, así como descargas de los ríos y los huracanes, podrían estar favoreciendo la aparición y dispersión de bacterias resistentes en el GoM (Escobedo-Hinojosa & Pardo-López, 2017). Por otro lado, los factores antropogénicos que repercuten en el GoM, como el drenaje de aguas residuales provenientes de industrias agrícolas, urbanas y nosocomiales que desembocan productos químicos en los sistemas fluviales del GoM, podrían estar favoreciendo la propagación de bacterias patógenas expuestas a diversos compuestos químicos, los cuales pueden estar ejerciendo una presión de selección. El posible impacto ambiental ocasionado por la actividad humana en los ecosistemas marinos del GoM aún se desconoce, pero podría estar influyendo en la aparición y distribución de bacterias resistentes (Lipp et al., 2002).

Un ejemplo sobre el fenómeno de resistencia en ambientes marinos es el trabajo descrito por Hong et al., (2018), quienes reportaron un aumento en la resistencia de bacterias marinas a tetraciclinas, aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, sulfonamidas y quinolonas, antibióticos utilizados en granjas acuícolas. La diseminación de material genético por medio de animales que habitan en el ecosistema marino favorece la transmisión de la resistencia a antibióticos. Gracias a este estudio realizado en las costas de Pekín y diversas ciudades a lo largo de la costa en China, se demostró que el uso de antibióticos representa un problema tanto para la acuicultura como para el ambiente marino, el cual estaría influenciado por la descarga de aguas residuales y fuentes antropogénicos; estos factores que contribuyen a la generación de BMR dentro de las zonas costeras del mar de China oriental.

Otro de los estudios que han reportado la presencia de bacterias resistentes en ambientes marinos es el publicado por Yang et al., (2019). En particular, este estudio se enfocó en la identificación de genes de resistencia tanto a metales pesados como a antibióticos a partir de bacterias presentes en muestras de macro y micro plásticos obtenidos de un sistema de corrientes marinas ubicadas en el norte del Océano Pacífico. Dentro de los resultados obtenidos destacan la identificación de genes de resistencia a metales como cobalto (*corT/coaT*), cobre(*copA/actP*) y arsénico (*arsB*), entre otros; además, se identificaron genes de resistencia a antibióticos como aminoglucósidos (*aac-(6)-ib*), bacitracina (*bac A*), *MLS* (macrólido-lincosamida-estreptogramina), entre otros. Este estudio demuestra que los plásticos son un problema de contaminación ambiental, y que los mares servirían como un reservorio de genes de resistencia tanto a metales pesados como a antibióticos y que estos podrían ser desplazados a cualquier parte del planeta gracias a las corrientes marinas.

La diversidad bacteriana y su ecología en ambientes marinos son áreas nuevas de investigación en México, la presencia de bacterias resistentes o con potencial de patogenicidad en estas áreas es reconocida como un asunto importante dadas las implicaciones tanto en salud pública como en la producción de alimentos y equilibrio del ecosistema (Perry et al., 2016). Realizar investigaciones en ambientes naturales, particularmente acuáticos, nos ayudaría a entender las interacciones entre bacterias ambientales y patógenas que se podrían estar generando en estos ecosistemas. Además, la contaminación podría estar afectando y acelerando las interacciones de estos microorganismos.

El objetivo del presente proyecto es conducir un estudio que permita determinar la presencia y diversidad de resistencia a antibióticos en aislados bacterianos obtenidos del GoM, mediante la caracterización de sus perfiles de resistencia. En este proyecto evaluaremos una colección de 89 cepas bacterianas aisladas del GoM, todas ellas proporcionadas por el grupo de la Dra. Liliana Pardo López, quien forma parte del Consorcio de investigación del Golfo de México.

### III. Justificación

La resistencia bacteriana a uno o varios antibióticos es un problema de salud pública tan grande que la Organización Mundial de la Salud ha implementado un Plan de Acción para combatir este fenómeno.

A pesar de esto, el estudio de la resistencia a los antimicrobianos en nuestro país sigue siendo escaso, enfocándose principalmente a ambientes clínicos y hospitalarios, dejando de lado ecosistemas con poco impacto antropogénico.

Por este motivo, es fundamental aumentar el estudio del fenómeno de resistencia a antimicrobianos en ambientes como el Golfo de México. El estudio de bacterias aisladas de este ambiente nos ayudará a tener una mejor comprensión del fenómeno de la resistencia a antibióticos en bacterias tanto patógenas como ambientales. Además de permitirnos saber si el Golfo de México puede ser un reservorio de bacterias resistentes a antibióticos que podrían tener impacto en la salud pública del país en el futuro.

## IV. Hipótesis

Las condiciones ambientales del GoM han propiciado la aparición de bacterias resistentes a antibióticos.

## V. Objetivos

### **Objetivo general:**

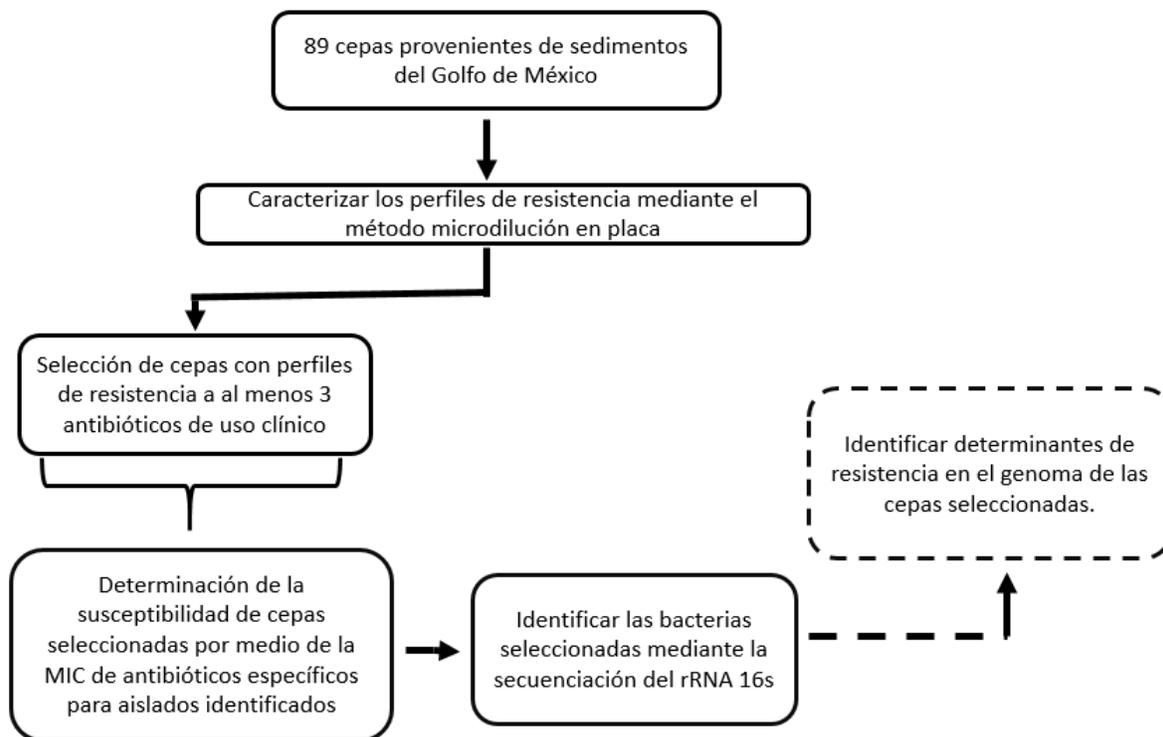
Determinar si en el Golfo de México existen bacterias resistentes a antibióticos.

### **Objetivos específicos:**

- Caracterizar los perfiles de resistencia a antibióticos de bacterias aisladas del Golfo de México.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria en las cepas que presenten resistencia a tres o más antibióticos de importancia crítica para la salud.
- Identificar las bacterias seleccionadas mediante la secuenciación del gen rRNA 16S.

## VI. Materiales y Métodos

### Diagrama general de trabajo



**Figura 1. Diagrama general de trabajo.** Esquema de los procedimientos y objetivos establecidos en el proyecto de investigación.

### Cepas utilizadas en el proyecto de investigación

En el presente trabajo se utilizó una colección de 89 cepas que fueron proporcionadas por la Dra. Liliana Pardo López quien forma parte del CIGoM. Las cepas fueron obtenidas de muestras de agua colectadas en diferentes zonas del sudoeste del GoM a diferentes profundidades, que van de los 30 a 1000 metros(m); siendo recolectadas tanto en sedimentos como en columnas de agua.

De las 89 cepas a evaluar se seleccionaron 62. El criterio de selección fue el crecimiento en medio LB a 37 °C. Estas cepas se utilizaron para los diferentes ensayos experimentales.

Las cepas proporcionadas fueron nombradas con una nomenclatura que va de GM1 a GM89 y se utilizaron para los ensayos posteriores. Dentro de esta colección, 10 de las 62 cepas aisladas del GoM se han identificado como *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* spp. Dentro de los diferentes ensayos se utilizaron las cepas de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1, como controles en los experimentos correspondientes.

De manera adicional, se utilizó una colección de aislados clínicos de *P. aeruginosa* nombrados de la siguiente manera con su número de identificación respectivo: P7(P6103), P8(P4660), P9(P3536), P10(P1165), P11(P1473), P12(P1483), P13(P1503), P14(P1546) y P15(P1547). Estas cepas fueron proporcionadas por el Dr. Rafael Franco del Instituto Nacional de Rehabilitación, gracias a una colaboración con nuestro grupo de trabajo.

## **Medios y condiciones de cultivo utilizados**

Las cepas proporcionadas se conservan a -70 °C en glicerol al 30% v/v. De manera general, el crecimiento de cultivos bacterianos se realizó en medio “Lysogeny Broth” (LB), el cual contiene peptona de caseína al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 0.5%. Las cepas fueron propagadas mediante estría cruzada en placas de agar LB fresco, las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 24hrs. Estas placas fueron utilizadas para los cultivos posteriores y se utilizaron hasta por un máximo de 2 semanas.

Los cultivos utilizados en los ensayos experimentales se inocularon en tubos que contenían 5 ml de medio LB y se incubaron a 35 °C  $\pm$  2 °C toda la noche durante 16- 18 hrs.

Para la selección y caracterización de cepas de *P. aeruginosa* se utilizó el agar selectivo cetrimida (Millipore), el cual contiene MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Agar, Glicerina y Bromuro de cetiltrimetilamonio; la preparación del medio se asemeja al agar LB, la diferencia está en añadir 10 ml de glicerol en un litro de agar y posteriormente esterilizar a 120 °C. Las placas se mantuvieron a 4° C en oscuridad hasta por 2 semanas para su utilización.

Para realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) se utilizó el medio Müller Hinton (MH) que está conformado por extracto de carne, peptona de caseína y almidón. Para generar el medio MH ajustado con cationes (CAMBH por sus siglas en inglés), al

medio MH se le adicionó 2.07 ml de una solución stock de cloruro de calcio por litro de MH y 0.87 ml de una solución stock de cloruro de magnesio por cada litro de MH para obtener el medio CAMHB.

### **Preparación de los inóculos**

Para la realización de los ensayos de susceptibilidad a antibióticos es necesario la preparación de los inóculos de las bacterias a probar. Para los ensayos de caracterización de perfiles de resistencia las bacterias se crecieron durante 18 hrs a 37° C en agitación, posteriormente se realizó una dilución 1:100 tomando una alícuota de 10 µl del cultivo y diluyendo con 990 µl de medio LB.

En el caso de los inóculos para la determinación de la MIC, estos se prepararon ajustando la densidad óptica (D.O) de los mismos hasta obtener una D.O. a 600 nm (D.O.<sub>600nm</sub>) de 0.6 (1 x 10<sup>8</sup> UFC/ml aproximadamente) utilizando medio MH como diluyente. Posteriormente, estos cultivos ajustados se utilizaron para inocular las microplacas del ensayo. Para cada pozo de la microplaca se agregó 10 µl de la suspensión bacteriana.

### **Cuantificación de la producción de piocianina.**

Para la determinación de la producción de piocianina se inocularon las cepas a probar en tubos de ensayo con 5 ml de medio LB y se incubaron con agitación a 37°C. La cuantificación del pigmento se realizó después de 24 h de crecimiento.

Para determinar la concentración de piocianina, los cultivos se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min a 4°C y se colectaron los sobrenadantes en tubos limpios. Posteriormente se realizó una extracción del pigmento utilizando cloroformo como solvente orgánico. Para realizar esta extracción, se colocaron 5 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo y se adicionaron 3 ml de cloroformo. El sobrenadante y el cloroformo se mezclaron circularmente por 1 min.

Posteriormente esperamos aproximadamente 30 min para la separación de fases del sobrenadante, la fase en la que se encuentra el pigmento deseado es de color azul. La fase orgánica (azul) se transfirió a un tubo limpio, al cual se le adicionó 1 ml de HCl 0.2 N y se mezcló suavemente con vórtex hasta obtener una coloración rosa-roja en la fase acuosa. La fase rosa-roja se transfirió a un tubo limpio y se cuantificó midiendo la absorbancia de la misma a 520 nm usando HCl 0.2 N como blanco.

Para cuantificar la producción de piocianina se multiplicó el valor de absorbancia obtenido de la cepa a probar por el coeficiente de extinción molar a 520 nm de 17.072, el resultado se expresó en  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Antibióticos utilizados**

La selección de los antibióticos se realizó con base en la lista de antibióticos críticos para la salud humana de la OMS y la disponibilidad de los mismos.

En el presente trabajo se utilizaron para el ensayo inicial de susceptibilidad en microplaca los antibióticos: ampicilina, oxacilina, cefoperazona, ciprofloxacino, colistina, eritromicina, kanamicina, tetraciclina y vancomicina a una concentración de 20 microgramos por mililitro.

Para determinar la MIC de las cepas seleccionadas, se utilizaron los siguientes antibióticos sugeridos en el manual *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, por sus siglas en inglés) para aislados de *Pseudomonas*: meropenem, imipenem, piperacilina, ceftazidima, ciprofloxacino, norfloxacino, amikacina, gentamicina y colistina según las pautas descritas en el manual.

### **Preparación de antibióticos**

Los antibióticos utilizados se prepararon a una concentración inicial de 5120  $\mu\text{g/ml}$ , los antibióticos se disolvieron con el diluyente adecuado que se menciona en las tablas de solventes y diluyentes en el manual CLSI. Las soluciones de antibiótico se esterilizaron por filtración con ayuda de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  y se repartieron en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  en tubos eppendorf estériles, estas alícuotas se mantuvieron guardadas a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los antibióticos que son sensibles a la luz se guardaron en tubos *eppendorf* estériles de color ámbar.

Para el ensayo inicial de susceptibilidad en microplaca, los antibióticos se diluyeron hasta obtener una concentración final de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Para obtener esta concentración: inicialmente se realizó una dilución 1:10 con 100  $\mu\text{l}$  de antibiótico y 900  $\mu\text{l}$  de LB para obtener una concentración de 512  $\mu\text{g/ml}$ , seguidamente se hizo una dilución 1:2 con 500  $\mu\text{l}$  del tubo anterior y 500  $\mu\text{l}$  de LB para obtener una concentración de 256  $\mu\text{g/ml}$  y por último se hizo una dilución 1:12.8 con 80  $\mu\text{l}$  del tubo anterior y 920  $\mu\text{l}$  de LB para tener una concentración final de 20  $\mu\text{g/ml}$  del antibiótico deseado.

Para la preparación de los antibióticos a utilizar en el ensayo de determinación de la MIC, se utilizó como diluyente medio CAMHB; según el protocolo establecido en el laboratorio. Los antibióticos utilizados se prepararon a una concentración inicial de 5120  $\mu\text{g/ml}$  y se esterilizaron por filtración con ayuda de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  para repartirse en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de cada uno de los antibióticos.

Cabe mencionar que para cada antibiótico se reporta un rango de concentraciones diferentes establecidas por el CLSI, por lo tanto, las diluciones seleccionadas para cada antimicrobiano son distintas y requieren prepararse utilizando diferentes diluciones, partiendo siempre de la concentración inicial de 5,120 µg/ml.; esto con el fin de determinar si una bacteria es resistente o sensible al fármaco probado.

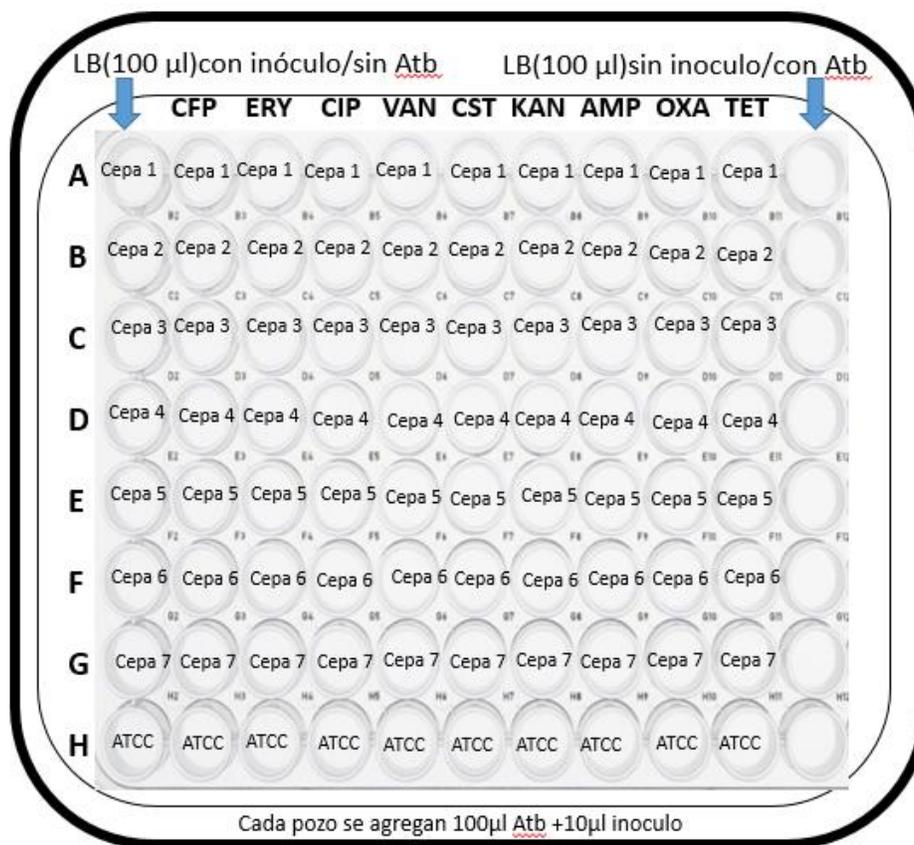
Para el antibiótico colistina, meropenem e imipenem se ajustaron a las siguientes concentraciones (en µg/ml): 32, 8, 4, 2 y 1. Los antibióticos gentamicina y norfloxacin se ajustaron a las siguientes concentraciones (en µg/ml): 32, 16, 4, 2 y 1. Para el caso del antibiótico amikacina se ajustó a las concentraciones (en µg/ml): 128, 64, 32, 16 y 8, para piperacilina se ajustó a 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 16 µg/ml y 8 µg/ml. En el caso del antibiótico ceftazidima se ajustó a las siguientes concentraciones (en µg/ml): 64, 32, 16, 8 y 4. Por último el antibiótico ciprofloxacino se ajustó a las concentraciones de: 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml y 0.5 µg/ml.

Para poder realizar el experimento se utilizó una microplaca de 96 pozos de cultivo, cada pozo con una concentración final de antibiótico correspondiente con medio CAMBH y el inóculo correspondiente de las cepas ya seleccionadas. En cada microplaca se agregó 100 µl de antibiótico (diluído en medio CAMBH) a la concentración a probar más 10 µl de inóculo ajustado. Para las diluciones del antibiótico colistina se utilizó medio MH sin ajuste de cationes, ya que la administración de cationes arroja MIC más altas de las esperadas según datos establecidos por el CLSI.

### **Determinación de susceptibilidad a antibióticos por método de microdilución en placa**

El método de microdilución en placa se utilizó de manera inicial para caracterizar los perfiles de resistencia de la colección de 89 cepas obtenidas del GoM y nos permitió hacer una selección preliminar de las bacterias resistentes a antibióticos.

Para poder realizar el experimento se utilizó una microplaca de 96 pozos de cultivo, cada pozo contendrá una concentración final del antibiótico a evaluar de 20 µg/ml (mencionado en la sección preparación de antibióticos) con medio LB y el inóculo correspondiente de cada una de las 62 cepas a evaluar. En la Fig. 2 podemos observar un esquema de la colocación de las cepas en la microplaca utilizada en el ensayo.



**Figura 2. Ensayo para la determinación inicial de resistencia.** Para determinar la resistencia a antibióticos de las diferentes cepas evaluadas se realizó un ensayo de microdilución en placa. Cada pozo contiene 100 µl de medio LB con el Atb (antibiótico) a evaluar a una concentración de 20 µg/ml más 10 µl de inóculo ajustado de las cepas aisladas del GoM. Como control del experimento se utilizó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, para evaluar el crecimiento natural de las cepas se inocularon pozos con LB sin antibiótico y como control de esterilidad se utilizaron pozos con medio LB sin inóculo.

Una vez que se prepararon las diluciones de los antibióticos ampicilina (AMP), oxacilina (OXA), cefoperazona (CFP), ciprofloxacino (CIP), colistina (CST), eritromicina (ERY), kanamicina (KAN), tetraciclina (TET) y vancomicina (VAN), se tomaron 100 µl de alícuota del antibiótico preparado y se agregó en cada pozo de la microplaca correspondiente a cada columna de cada antibiótico (Fig.2). Una vez agregados los 100 µl de antibiótico, se tomó una alícuota de 10 µl de la suspensión bacteriana (preparada), para inocular el pozo correspondiente de la microplaca. Cada sección de la microplaca, es decir: A,B,C,D,E,F,G y H correspondía a una hilera de un inóculo diferente, en la hilera H de la microplaca se inoculó la cepa control que se utilizó.

Las microplacas se incubaron a 37°C durante 16-24 h. La lectura del crecimiento bacteriano se realizó primero observando a simple vista cada uno de los pozos de la microplaca de 96 pozos y posteriormente se leyó la microplaca a una D.O.<sub>600nm</sub> en un lector de microplacas.

Para determinar si una bacteria era resistente o sensible a los antibióticos probados, se calculó el porcentaje de crecimiento de la bacteria frente al antibiótico probado. Este porcentaje de crecimiento se determinó mediante la multiplicación de los valores de densidad óptica obtenidos en el pozo de microplaca que contenía antibiótico por 100 y se dividió entre el valor obtenido en el pozo correspondiente al control de crecimiento sin antibiótico, como se observa en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{D.O. \text{ cepa+antibiótico} \times 100}{D.O. \text{ control}} .$$

Se determinó que una bacteria era resistente cuando había un crecimiento mayor al 50% en presencia de un antibiótico según el protocolo establecido por Bhullar et al., (2012).

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cepas seleccionadas**

El método de concentración mínima inhibitoria en microplaca se utilizó para determinar la susceptibilidad de las cepas seleccionadas a antibióticos específicos para los aislados identificados.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria correspondiente para cepas de *Pseudomonas* seleccionadas y cepas no identificadas que presentaban perfiles de resistencia interesantes. Para ello, se utilizaron como control las cepas de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* P-10 y *P. aeruginosa* ATCC 27853; se muestran en la sección ATCC correspondiente a la cepa control (Fig. 3).



**Figura 3. Ensayo de determinación de MIC.** Para determinar la susceptibilidad a los diferentes antibióticos específicos para las cepas de *Pseudomonas*, se determinó la concentración mínima inhibitoria de cada una de las cepas seleccionadas. En cada pozo se agregó 100 µl de Atb(antibiótico) y 10 µl de inóculo ajustado. El control *E. coli* ATCC 25922 y otras cepas control se utilizaron dentro del ensayo y se utilizaron pozos con Muller Hinton(MH) como control de esterilidad, así como pozos con MH e inóculo como control de crecimiento.

En cada pozo correspondiente se agregó 100µl de antibiótico a la concentración establecida y 10µl de inóculo en cada pozo de microplaca; cada sección A, B, C, D, E, F, G y H de la microplaca correspondía a una hilera de un inóculo diferente.

Se utilizaron pozos de control de esterilidad (ES) donde solamente se agregó 100µl de CAMHB. En los pozos de crecimiento (MH con inóculo) se agregó 100 µl de MH y 10 µl de inóculo.

Las microplacas se incubaron a 37°C durante 16-24 hrs. La lectura del crecimiento se realizó primero observando a simple vista cada uno de los pozos de la microplaca de 96 pozos y posteriormente se leyó la microplaca a una D.O.600nm en un lector de placas Epoch™ 2 (Biotek™).

Una vez realizado el ensayo, se utilizaron los valores obtenidos de la determinación de la concentración mínima inhibitoria para clasificar los diferentes aislados como resistentes, intermedios o sensibles; según lo reportado en el manual del CLSI (2017).

### **Extracción de DNA genómico de cepas seleccionadas**

Para la identificación de las cepas bacterianas seleccionadas se realizó la extracción de DNA mediante el protocolo descrito por Green y Sambrook con algunas modificaciones (2019). El procedimiento se explica brevemente a continuación.

Se sembró una colonia de la cepa de interés en 5 ml de medio LB, se utilizaron dos tubos por cepa, se incubaron a 37° C con agitación durante 18 hrs. Posteriormente se recolectó 3 ml del cultivo celular mediante centrifugación en un tubo de microcentrifuga y se re-suspendió el paquete celular con 400µL de buffer TE a pH 8.0. Después se adicionó 30 µL de SDS al 20% y se agitó vigorosamente durante 30 seg y se colocó en hielo durante 30 seg, se repitió 3 veces este ciclo y posteriormente los tubos se incubaron durante 30 min a 55°C.

Transcurrido el tiempo se dejó enfriar a los tubos a temperatura ambiente y se adicionaron 5 µL de RNasa, los tubos se incubaron durante 15 min a 37 °C. Después, se adicionaron 500 µL de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico y se mezcló el tubo hasta formar una emulsión. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 13 000 rpm para formar dos fases, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y estéril.

Posteriormente se adicionaron 25 µL de NaCl 5M, 50 µL de H<sub>2</sub>O grado biología molecular y 950 µL de etanol absoluto. Los tubos se mezclaron y se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 min y seguidamente se eliminó el sobrenadante. Se adicionó 500 µL de isopropanol y 50 µL de acetato de amonio para precipitar el DNA a -20 °C durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó de nuevo durante 10 min a 13 000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

Posteriormente el DNA se lavó con 500 µL de etanol al 70%, se permitió la evaporación del etanol restante. El DNA se resuspendió en 100 µL de TE. El DNA se conservó a -20°C y se cuantificó para su manipulación.

Se cuantificó y determinó la calidad del DNA mediante espectrofotometría utilizando un equipo NanoDrop™ 1000 y su posterior visualización se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

### **Oligonucleótidos utilizados en el proyecto de investigación**

Para la identificación taxonómica de las cepas aisladas mediante secuenciación del gen rRNA 16S, se utilizaron los oligonucleótidos 16S-fD1 y 16S-rP2 (Tabla 3).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la caracterización de cepas aisladas

Oligonucleótidos	Secuencia (5' a 3' se sintetiza)	Fuente
16s-fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Weisburg et al., 1991)
16s-rP2	CGGCTACCTGTTACGACTT	(Weisburg et al., 1991)

### **Identificación de las cepas seleccionadas por secuenciación de rRNA 16S**

La identificación de bacterias resistentes a antibióticos aisladas del GoM se realizó mediante la secuenciación y análisis del gen *rRNA 16S* (Weisburg et al., 1991). Primeramente, se realizó la extracción del DNA utilizando el protocolo de Green y Sambrook (2019), con las modificaciones que se mencionaron anteriormente.

La amplificación del gen *rRNA 16S* se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR, por sus siglas en inglés), utilizando los oligonucleótidos cuya secuencia se muestra en la (Tabla 2).

Para realizar la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa, se preparó un “master mix” que contenía 20 µL de Buffer 10X de KCl, 8 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 4 µL de dNTPs (10 mM) (contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2 µL de oligo forward (25 µM), 2 µL de oligo reverse (25 µM) y 1 µL de TaqPol *Thermo SCIENTIFIC* (Taq DNA polymerase recombinant 10X), por último, se agregó 160 µL de agua milli Q y se agitó en el vortex cuidadosamente. La mezcla de reacción se dividió en 4 tubos de reacción, donde cada tubo contenía 49 µL del master mix y 1 µL DNA correspondiente de aislados GM9, GM11 y PAO1.

Posteriormente, el gen *rRNA* 16S se amplificó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 min y 94°C durante 1 min para el proceso de desnaturalización, 50°C durante 1 min para el proceso de hibridación, 72°C durante 1 min 50 seg para el proceso de extensión, esto repetido por 32 ciclos y finalmente un paso de 72°C durante 5 min.

Para analizar la integridad del amplicón se realizó una electroforesis en agarosa al 0.8% y posteriormente el material genético se purificó con el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se determinaron las concentraciones del producto utilizando el equipo NanoDrop™ 1000. Una vez evaluada la calidad del producto de PCR, el amplicón se secuenció en la unidad de síntesis y secuenciación de Instituto de Biotecnología de la UNAM. La identificación de las cepas se realizó utilizando la secuencia del gen *rRNA* 16S obtenida por medio del servidor EZBioCloud (Yoon et al., 2017).

## VII. Resultados

### **Caracterización de los perfiles de resistencia por método de microdilución en placa**

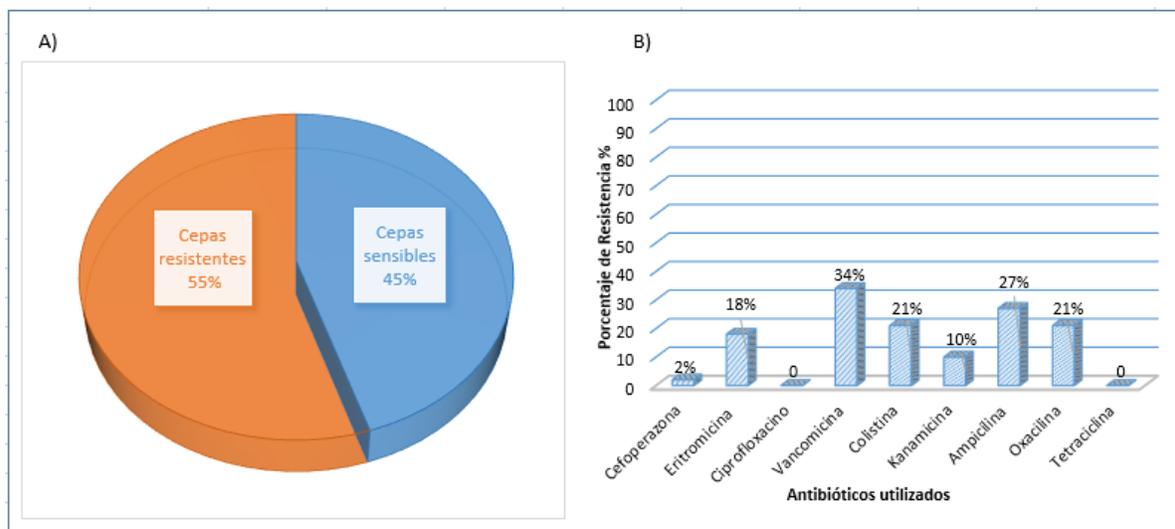
Con el propósito de evaluar la RAM en el GoM se realizaron ensayos de susceptibilidad con los antibióticos ya mencionados anteriormente para determinar los perfiles de resistencia de una colección de 89 cepas del GoM, utilizando el parámetro para calcular la resistencia en aislados ambientales propuesto por Bhullar et al., 2012. Los antibióticos probados se comentan en la sección lista de antibióticos utilizados de Materiales y Métodos.

Para validar los resultados del análisis de microplacas se utilizaron como control a las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, según el caso. Las cepas control utilizadas tenían que presentar un perfil de resistencia dentro de los parámetros marcados por el CLSI. En todos los ensayos realizados, el crecimiento de los controles fue adecuado y por lo tanto validan la utilización de estas cepas control en experimentos posteriores.

De las 89 cepas a evaluar, solo 62 cepas pudieron crecer en LB, por lo que estas cepas se seleccionaron para los experimentos posteriores. Del total de las 62 cepas, el 55% de las cepas mostraron resistencia a 1 o más antibióticos, mientras que el 45% de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos probados. Esto se determinó observando el crecimiento de nuestras cepas a concentraciones de 20 µg/ml de los diferentes antibióticos (Fig. 4 A).

Interesantemente, los resultados exhiben una remarcada presencia de cepas resistentes, el porcentaje de resistencia fue de: vancomicina 34%, ampicilina 27%, oxacilina 21%, kanamicina 10%, eritromicina 18% y colistina 21% (Fig. 4B). Este último antibiótico se utiliza para combatir infecciones por bacterias Gram-negativas en humanos; en los últimos años ha ganado relevancia como tratamiento utilizado de último recurso para infecciones bacterianas. Tanto el ciprofloxacino como tetraciclina tuvieron un 0% de resistencia, ya que no hubo crecimiento bacteriano frente a estos antibióticos (Fig. 4B).

Estos resultados muestran que más de la mitad de las cepas evaluadas presentan resistencia a los antibióticos probados, los cuales se utilizan con frecuencia en ambientes clínicos. Es interesante que estas bacterias aisladas de ambientales naturales presenten resistencia a antibióticos utilizados en la práctica clínica, incluso cuando no están expuestas directamente a estos fármacos dentro de sus nichos ecológicos (Fig. 4A).



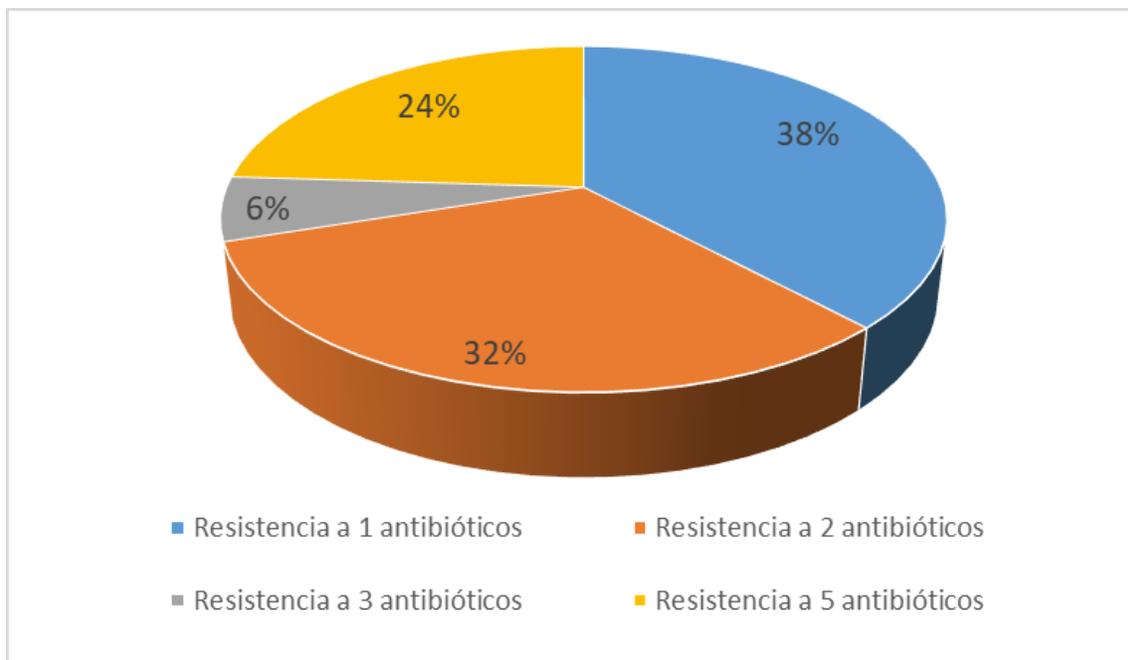
**Figura 4. Cepas bacterianas que presentan resistencia a antibióticos.** A) De un total de 62 cepas evaluadas provenientes del GoM, se muestra el porcentaje de resistencia de cepas bacterianas a los antibióticos probados. B) Se muestran nueve antibióticos utilizados dentro de los ensayos, el porcentaje 0 de algunos antibióticos indica que hubo sensibilidad frente a ese antibiótico.

Aunado a esto, es interesante poder encontrar cepas resistentes a colistina, el cual es uno de los antibióticos de última elección para infecciones bacterianas, además de antibióticos que actúan en la pared celular como  $\beta$ -lactámicos y glucopéptidos, que son los fármacos más utilizados como tratamiento primario en infecciones.

Posteriormente, como parte del análisis de los resultados obtenidos en la caracterización de perfiles de resistencia de bacterias aisladas del GoM, clasificamos a los diferentes aislados de acuerdo con el número de antibióticos al que presentaron resistencia como: resistente a 1 antibiótico, resistente a 2 antibióticos, resistente a 3 antibióticos y resistente a 5 o más antibióticos; la resistencia a 4 antibióticos no se observó y por lo tanto no se muestra en la gráfica (Fig. 5).

Como se observa en la Fig. 5, de las 62 cepas evaluadas se determinó que el 38 % de las mismas presentaban resistencia a 1 antibiótico, dentro de estas cepas se destacan: GM15, GM57, GM58 y GM59, aisladas a 55 m de profundidad; las cepas GM45, GM54, GM60, GM63, GM85 y GM86, aisladas a profundidades de 1000 m; y por último el aislado GM24 que se obtuvo a 3010 m; todos los aislados fueron obtenidos en columnas de agua. El aislado GM24 se identificó posteriormente como *Staphylococcus epidermidis*, una bacteria que forma parte de la microbiota de la piel de humanos, pero en personas inmunocomprometidas es patógena (Wijesekara, 2017).

Para el caso de las cepas resistentes a 2 antibióticos, en la Fig. 5 se observa un porcentaje de resistencia de 32%, destacando: las cepas GM9, GM10, GM11, GM18 y GM20, aisladas a una profundidad de 55 m; las cepas GM50, GM52 y GM53 fueron obtenidos 69 m; y por último GM83 se obtuvo a 72 m y GM84 a 1000 m de profundidad; todos los aislados fueron obtenidos en columnas de agua.



**Figura 5. Cepas resistentes a uno o más antibióticos.** Se observa el porcentaje de resistencia de 1 o más antibióticos de cepas bacterianas que pudieron conferir resistencia a los fármacos probados. La resistencia a 4 antibióticos no se observó en ninguna cepa por lo que no se muestra el gráfico.

Como se muestra en la Fig. 5, solo un 6% de las 62 cepas evaluadas presentaron resistencia a 3 antibióticos, estas son: GM29, la cual se aisló de sedimento cerca de la estación SOGOMII 4 y GM44 que se aisló a 1000 m en columna de agua. La cepa GM29 se identificó posteriormente como *Bacillus*

*cereus*, bacteria que se caracteriza por producir endotoxinas y causar intoxicaciones en humanos (Levy, 2002).

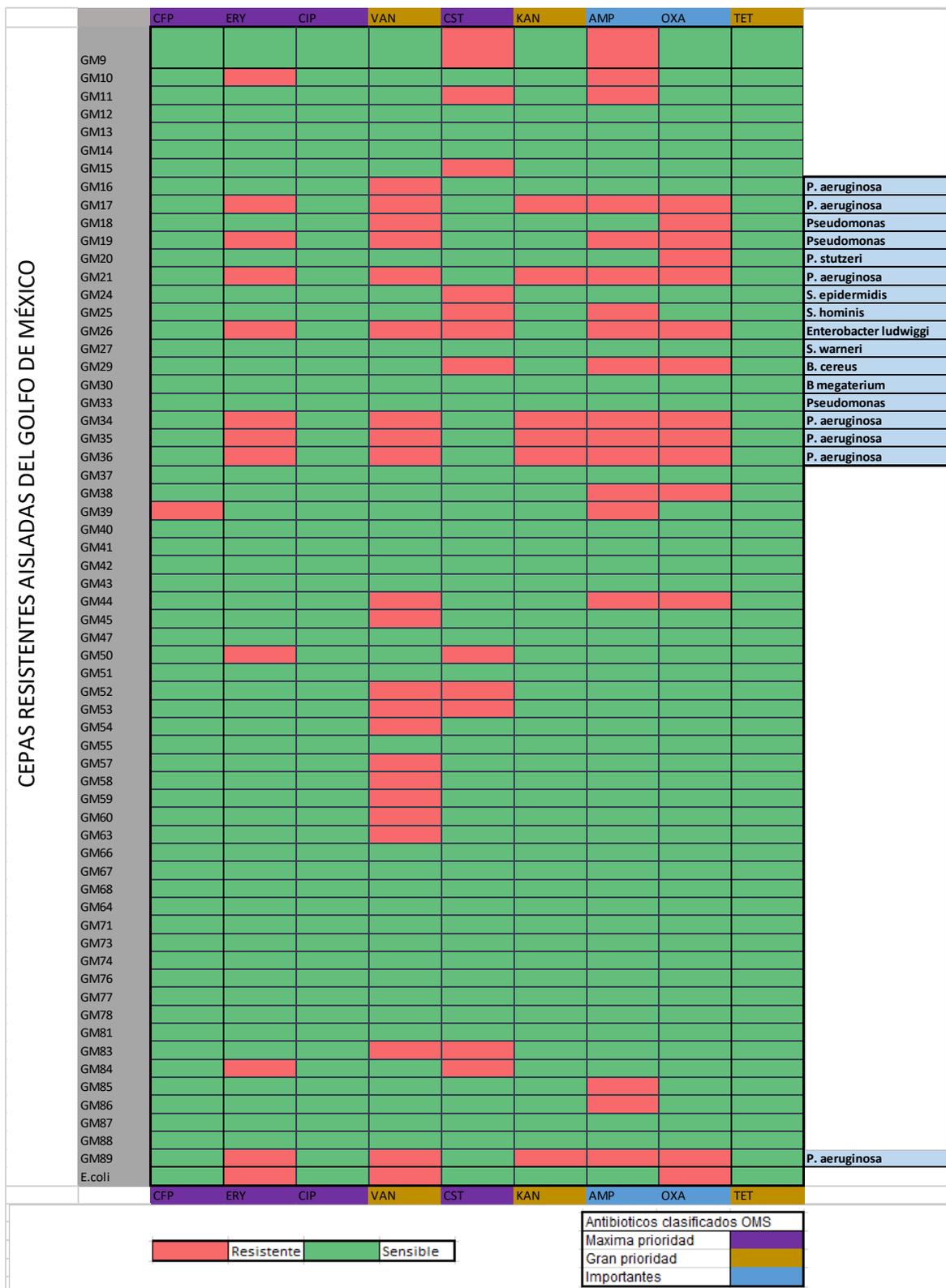
Por último, como se muestra en la Fig. 5, el 24% del total de cepas evaluadas exhibieron resistencia a 5 antibióticos, estas son GM17, GM21 y GM19, aisladas a 55 m de profundidad, GM26 que fue aislada de sedimento cerca de la estación SOGOMII 2, así como GM34, GM35, GM36 y GM89, aisladas a profundidades de 1000 m. Estas cepas fueron las que exhibieron resistencia a un mayor número de antibióticos. Las cepas GM17, GM21, GM34, GM35, GM36 y GM89 se identificaron como *P. aeruginosa*, mientras que la cepa GM19 se identificó como *Pseudomonas spp.* y la cepa GM26 como *Enterobacter ludwigii*.

Es interesante destacar que estos resultados muestran que bacterias aisladas tanto de sedimentos y columnas de agua puedan presentar resistencia a fármacos de uso clínico, lo cual podría sugerir la presencia de factores ambientales y antropogénicos que favorecen la generación de determinantes de resistencia en bacterias.

Estos resultados demuestran la existencia de bacterias resistentes en el GoM, y sugieren que este ecosistema puede ser un reservorio de genes de resistencia, además las bacterias patógenas presentes podrían estar interaccionando con las bacterias ambientales del GoM. Estas interacciones podrían conllevar a la HGT y con ello la circulación y adquisición de determinantes de resistencia entre patógenos de importancia médica.

### **Selección de cepas del GoM con perfiles de resistencia relevantes**

Con los resultados anteriores, se pudieron determinar los perfiles de resistencia iniciales de la colección de 62 cepas obtenidas del GoM. En la Fig 6 podemos observar un gráfico donde se muestran los diferentes perfiles de resistencia determinados para cada una de las cepas evaluadas a concentraciones de 20 µg/ml de los fármacos probados. En rojo se muestran las cepas que fueron resistentes a los antibióticos probados y en verde se muestran aquellas cepas que fueron sensibles. Del lado derecho se muestran la identidad de algunas de las cepas evaluadas, la cual fue realizada con anterioridad por parte de nuestro grupo de trabajo y el CIGoM.



**Figura 6. Perfiles de resistencia a antibióticos que presentan las cepas bacterianas aisladas del Golfo de México.** Censo de datos obtenidos a partir de los ensayos de susceptibilidad por método de microdilución en placa. El color verde indica las cepas sensibles al antibiótico y que por lo tanto no pudieron crecer frente a este compuesto, por otra parte, el color rojo indica que las cepas son resistentes al antibiótico utilizado, ya que tuvieron un crecimiento mayor al 50% frente al antibiótico probado. En la parte inferior de la figura se observan las abreviaciones correspondientes a los antibióticos utilizados: Cefoperazona (CFP), Eritromicina (ERY), Ciprofloxacino (CIP), Vancomicina (VAN), Colistina (CST), Kanamicina (KAN), Ampicilina (AMP), Oxacilina (OXA) y Tetraciclina (TET).

Como se puede observar, las cepas que se han identificado como *P. aeruginosa* exhibieron un perfil de resistencia a más de 3 antibióticos relevantes (Fig. 6); sin embargo, otras cepas identificadas, también exhibieron perfiles de resistencia interesantes. Por ejemplo, *Pseudomonas stutzeri* (GM20) presentó un crecimiento a concentraciones de 20 µg/ml de los antibióticos oxacilina y colistina; *Enterobacter ludwigii* (GM26) presentó resistencia a eritromicina, vancomicina, colistina, ampicilina y oxacilina; por último, *Bacillus cereus* (GM29) presentó resistencia a colistina, ampicilina y oxacilina (Fig. 6).

Los resultados obtenidos demuestran una clara variedad de cepas resistentes a diversos antibióticos, siguiendo un patrón de resistencia inclinado hacia antibióticos β-lactámicos (oxacilina y ampicilina) y glucopeptidos (vancomicina), siendo estos antibióticos inhibidores de la pared celular. Además, hubo una remarcada presencia de resistencia a Colistina (polimixina), antibiótico que inhibe la formación de la membrana externa.

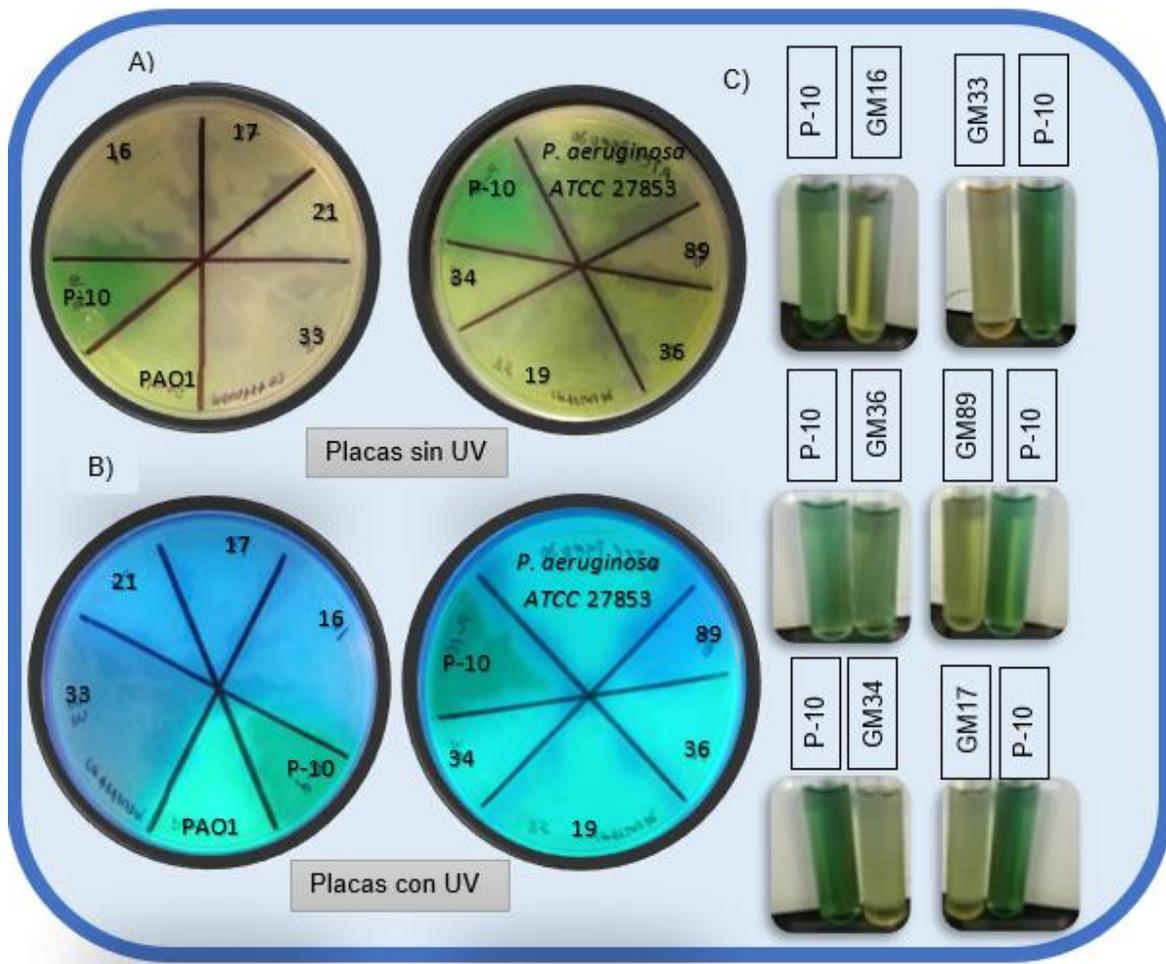
Estos resultados preliminares nos permitieron seleccionar algunas cepas para continuar el análisis de la RAM. Para esto se seleccionaron aislados de *Pseudomonas spp.*, *P. aeruginosa* y otros aislados no identificados (GM9, GM11, GM52, GM53, GM54, GM83 y GM84), los cuales cumplieron con los siguientes criterios de selección: 1) ser resistentes a 3 o más antibióticos; 2) mostrar resistencia a colistina.

Queda pendiente la identificación de todas las cepas que presentaron resistencia a algún antibiótico. Esto permitirá caracterizar con más detalle su patrón de resistencia usando los antibióticos recomendados por el CLSI según cada especie bacteriana.

### **Caracterización parcial de cepas de *Pseudomonas* aisladas del GoM**

Las cepas GM16, GM17, GM19, GM21, GM21, GM33, GM34, GM35, GM36, GM89 se identificaron como especies del género *Pseudomonas* con anterioridad y la mayoría pertenecen a la especie *P. aeruginosa*.

Decidimos caracterizar fenotípicamente estas cepas para corroborar con pruebas fenotípicas su género y especie. Para esto, se crecieron en agar cetrimida. Este medio es selectivo para cepas de *Pseudomonas* y permite la identificación del género (Fig 7).



**Figura 7. Aislamiento de cepas de *Pseudomonas* spp. y *P. aeruginosa*.** A) Se muestran los aislados GM16, GM17, GM19-2 (GM20-1 no se observan en la figura) GM21, GM33, GM89, GM34, GM36, P-10, PAO1 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, estriadas en placas agar cetrimida no expuestas a luz UV. B) Se observa fluorescencia de las cepas al ser expuestas a luz UV. C) Se observan los pigmentos pirocianina y fluoresceína.

Como se observa en el panel A de la Fig. 7, los aislados GM16, GM17, GM19, GM20, GM21, GM33, GM89, GM34, GM36, P-10, PAO1 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 fueron capaces de crecer en el agar cetrimida; lo que confirma la identidad a nivel de género de estos aislados. Se puede observar en el panel B de la Fig.7 la fluorescencia generada por las diferentes cepas de *Pseudomonas* cuando éstas se visualizaron con luz UV. El agar cetrimida favorece la observación de pigmentos como la pirocianina (color azul verdoso) y la fluoresceína (amarillo verdoso). El fenotipo mostrado por las cepas apoya la pertenencia de las cepas al género *Pseudomonas*.

Adicionalmente, se cuantificó la producción de piocianina de los aislados de *Pseudomonas*. La piocianina es un pigmento azul-verdoso derivado de las fenazinas, producido exclusivamente por las cepas de *P. aeruginosa*; la piocianina es un pigmento que se ha reportado como un factor de virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* (Sumita & Fukasawa, 1996).

Como se puede observar en panel C de la Fig.7, el sobrenadante de los cultivos de las cepas evaluadas muestra un color azul-verdoso que probablemente corresponde al pigmento piocianina. Se observa también un tubo con el sobrenadante del aislado clínico de *P. aeruginosa* P-10 que se caracteriza por tener una sobreproducción de piocianina.

Posteriormente se realizó la cuantificación de piocianina mediante la extracción orgánica del mismo con cloroformo, como se menciona en la sección: cuantificación de la producción de piocianina de Materiales y Métodos. La concentración de piocianina está expresada en  $\mu\text{g}$  de sobrenadante de cultivo y se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar a 520 nm de 17.072. Se utilizó la cepa PAO1 como control del experimento (Tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de la producción de piocianina

CEPA	Abs 520	Concentración de piocianina ( $\mu\text{g/ml}$ )	CEPA	Abs 520	Concentración de piocianina ( $\mu\text{g/ml}$ )
PAO1	0.192	3.27	GM21	0.024	0.40
GM16	0.085	1.45	GM34	0.29	5.01
GM17	0.129	2.20	GM35	0.191	3.26
GM19	0.097	1.65	GM36	0.223	3.80
GM20	0.191	3.26	GM89	0.302	5.15

Las cepas GM17, GM16, GM19 y GM21 presentaron una menor producción que la cepa control PAO1, las cepas GM20, GM36 y GM35 mostraron una producción similar al de la cepa PAO1, mientras que las cepas GM34 y GM89 mostraron una producción superior al de la cepa PAO1 (Tabla 3).

El análisis de producción de piocianina apoya que las cepas GM20, GM35, GM36, GM34 y GM89 son aislados de *P. aeruginosa* con una gran producción de piocianina.

## **Determinación de la concentración mínima inhibitoria de distintos antibióticos en cepas del GoM**

Para continuar con el análisis de la RAM en el GoM, se procedió a realizar la determinación de la MIC de distintos antibióticos en diferentes cepas seleccionadas con los criterios mencionados anteriormente. Comenzamos con hacer este análisis para las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Nuestros resultados iniciales demostraron que las cepas de *Pseudomonas* aisladas del GoM presentan resistencia a los antibióticos eritromicina, vancomicina, ampicilina y oxacilina, a una concentración de 20ug/ml (Fig.6). Sin embargo, según datos emitidos por el CLSI (2017), las cepas de *Pseudomonas* pueden presentar resistencia intrínseca a eritromicina, vancomicina, ampicilina y oxacilina. Por todo esto, se decidió continuar con el análisis de la resistencia a antibióticos de las cepas de *Pseudomonas* utilizando los antibióticos recomendados por el CLSI. Además, se determinó también la MIC a una colección de cepas clínicas de *P. aeruginosa* (P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14 y P15). Esto con el fin de comparar los perfiles de resistencia de cepas de *Pseudomonas* ambientales y clínicas.

Se utilizaron 9 antibióticos: meropenem (MEM), imipenem (IMP), piperacilina (PIP), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), amikacina (AMK), gentamicina (GEN) y colistina (CST), según lo recomendado por el CLSI (2017).

En la Fig. 8 se muestran las MIC determinadas para cada una de las 10 cepas de *Pseudomonas* aisladas del GoM, con los antibióticos correspondientes. Como controles se muestran también los resultados para las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Por último, también se utilizó a las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922. Cada ensayo de MIC se realizó por triplicado.

En color rojo se resaltan aquellos aislados a los que se les determinó una MIC que los clasifica como resistentes; en color verde se resaltan aquellos aislados a los que se clasificaron como resistencia intermedia; en color blanco se muestra aquellos aislados a los que se les determinó una MIC que los clasifica como sensibles (Fig.8).

Aislado	Especie	MEM	IPM	NOR	CIP	AMK	GEN	CAZ	PIP	CST
GM16	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 4	MIC: 8	-	-	MIC: 8	MIC: 4	-	MIC: 64	MIC: 4
GM17	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 4	MIC: 8	MIC: 2	-	MIC: 8	MIC: 4	-	MIC: 64	MIC: 4
GM21	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 4	MIC: 4	-	-	MIC: 8	MIC: 4	-	MIC: 64	MIC: 4
GM33	<i>Pseudomona sp.</i>	MIC: 8	-	-	-	MIC: 8	-	-	MIC: 16	MIC: 4
GM34	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 4	-	MIC: 4	-	MIC: 8	MIC: 4	-	MIC: 16	MIC: 8
GM35	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 4	MIC: 2	MIC: 2	-	MIC: 16	MIC: 16	-	MIC: 128	MIC: 4
GM36	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 4	-	MIC: 4	-	MIC: 8	MIC: 4	-	MIC: 16	MIC: 8
GM89	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 4	MIC: 8	MIC: 1	-	MIC: 8	MIC: 4	-	MIC: 64	MIC: 4
GM20	<i>P. stutzeri</i>	MIC: 4	-	MIC: 2	-	MIC: 8	-	-	MIC: 16	MIC: 4
GM19	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 4	-	-	-	MIC: 16	MIC: 4	-	MIC: 64	MIC: 4
PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 4	MIC: 8	-	-	-	MIC: 4	-	MIC: 16	MIC: 2
P-10	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 8	MIC: 4	MIC: 2	MIC: 1	-	MIC: 4	MIC: 16	MIC: 64	MIC: 8
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	MIC: 0.008-0.06	MIC: 0.006-0.25	MIC: 0.03-0.12	MIC: 0.004-0.016	MIC: 0.5-4	MIC: 0.25-1	MIC: 0.08-0.5	MIC: 1-4	MIC: 0.25-2
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 0.12-1	MIC: 1-4	MIC: 1-4	MIC: 0.25-1	MIC: 1-4	MIC: 0.5-2	MIC: 1-4	MIC: 1-8	MIC: 0.5-4
Parámetro de susceptibilidad CLSI		≤2 4 8 ≥ S I R	≤2 4 8 ≥ S I R	≤4 8 16 ≥ S I R	≤1 2 4 ≥ S I R	≤16 32 64 ≥ S I R	≤4 8 16 ≥ S I R	≤8 16 32 ≥ S I R	≤16 64 128 ≥	≤2 4 ≥ S R
						Resistente (R)	Intermedio (I)	Sensibles (S)		

**Figura 8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cepas de *Pseudomonas* aisladas del GoM.** Los aislados que no pudieron crecer en presencia del antibiótico a la concentración más baja, se reportan con guión (-). El parámetro de clasificación muestra los rangos de R (Resistente), I (intermedio), S (sensibles) reportados por el CLSI para los aislados de *Pseudomonas*, cada rango de susceptibilidad tiene diferentes concentraciones según el antibiótico correspondiente. En la parte inferior se muestran los parámetros de susceptibilidad reportados para aislados de *Pseudomonas* por el CLSI. Antibióticos probados: MEM: Meropenem; IPM: Imipenem; NOR: Norfloxacin; CIP: Ciprofloxacino; AMK: Amikacina; GEN: Gentamicina; CAZ: Ceftazidima; PIP: Piperacilina; CST: Colistina. Todas las MIC que se reportan con un signo (>) quiere decir que la concentración es mucho mayor que las concentraciones reportadas por el CLSI.

Como se puede observar, la mayoría de los aislados de *Pseudomonas* presentaron una MIC de 4 µg/ml para el antibiótico meropenem; catalogados como resistencia intermedia. Destacando solamente los aislados GM33 y P-10 (aislado clínico) con una MIC de 8 µg/ml; catalogados como resistentes (Fig.8). Interesantemente, el aislado GM33 no presentó resistencia a antibióticos β-lactámicos en las pruebas iniciales de caracterización de perfiles de resistencia a 20 µg/ml (Fig.6).

Esto nos habla de que posiblemente las concentraciones a las que se exponen estas bacterias a moléculas antibacterianas no son tan elevadas en el GoM; lo que explicaría el crecimiento a una MIC de 8 µg/ml o 4 µg/ml y no un crecimiento en 20 µg/ml.

Los aislados GM16, GM17, GM 89 y PAO1 presentaron una MIC de 8 µg/ml para el antibiótico imipenem; catalogados como resistentes. Por otra parte, los aislados GM21 y P-10 presentaron una MIC de 4 µg/ml; catalogados como resistencia intermedia para el antibiótico ya mencionado (Fig.8). Interesantemente, los antibióticos carbapenémicos son clasificados por la OMS como de gran prioridad, debido a que constituyen uno de los pocos o el único tratamiento disponible para combatir infecciones bacterianas graves en humanos.

Por otro lado, para la piperacilina que también pertenece a la familia de los β-lactámicos, se mostró una resistencia intermedia en los aislados GM16, GM17, GM21, GM89 y GM19, con una MIC de 64 µg/ml, catalogada como resistencia intermedia; solamente el aislado GM35 presentó una MIC de 128 µg/ml; catalogada como resistente (Fig.8). El aislado GM35 presentó resistencia a AMP y OXA (antibióticos β-lactámicos) en las pruebas iniciales de perfiles de resistencia (Fig.6). Es posible que este aislado clínico presente resistencia a varios antibióticos β-lactámicos, los cuales inhiben la síntesis de la pared celular.

Para el caso de antibióticos aminoglucósidos, solamente el aislado GM35 presentó resistencia a gentamicina, con una MIC de 16 µg/ml; este aislado fue único en mostrar resistencia a antibióticos aminoglucósidos. Esto es interesante porque la resistencia a este tipo de fármacos es poco frecuente en cepas de *Pseudomonas* de ambientes clínicos.

Todos los aislados del GoM pertenecientes al género *Pseudomonas* presentaron resistencia al antibiótico colistina, con una MIC de 4 µg/ml. La colistina es uno de los antibióticos de última elección en el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias Gram-negativas. Es importante resaltar que los aislados del GoM no fueron resistentes a los antibióticos norfloxacin, amikacina, ciprofloxacino y ceftazidima (Fig.8). De manera adicional, se utilizó un aislamiento proveniente del Golfo de México nombrado GoM7, que pertenece al género *Pseudomonas*. Curiosamente este aislado solamente presentó resistencia intermedia a meropenem (MIC:4 µg/ml) y resistencia a colistina (MIC:4 µg/ml) (Fig.9).

Por otro lado, los aislados clínicos de *P. aeruginosa* presentaron resistencia a múltiples antibióticos. Estos aislados fueron proporcionadas al grupo de trabajo por el Dr. Rafael Franco del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Como se observa en la Fig.9, las cepas P7 (P6103), P8 (P4660), P11 (P1473), P12 (P1483), P13 (P1503) y P15 (P1547) presentaron resistencia a los antibióticos IMP y MEM, con una MIC de 32 µg/ml, y a los antibióticos CAZ y PIP, con una MIC de 64 µg/ml y 256 µg/ml, respectivamente.

Aislado Clínico	Especie	MEM	IPM	NOR	CIP	AMK	GEN	CAZ	PIP	CST
P6103 (P7)	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: >32	MIC: 32	MIC: >32	MIC: >8	MIC: >128	MIC: >32	MIC: >64	MIC: >256	MIC: 8
P4660 (P8)	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: >32	MIC: 32	MIC: >32	MIC: >8	MIC: >128	MIC: >32	MIC: >64	MIC: 128	MIC: 4
P3536 (P9)	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: >32	MIC: 32	MIC: 4	-	MIC: 64	MIC: 4	MIC: >64	MIC: >256	MIC: 4
P1165 (P10)	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 8	MIC: 4	MIC: 2	MIC: 1	-	MIC: 4	MIC: >16	MIC: 64	MIC: 8
P1473 (P11)	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: >32	MIC: 32	MIC: >32	MIC: >8	MIC: >128	MIC: >32	MIC: >64	MIC: 128	MIC: 4
P1483 (P12)	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: >32	MIC: 32	MIC: >32	MIC: >8	MIC: >128	MIC: >32	MIC: >64	MIC: >256	MIC: 8
P1503 (P13)	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: >32	MIC: 32	MIC: >32	MIC: >8	MIC: >128	MIC: >32	MIC: >64	MIC: >256	MIC: 8
P1546 (P14)	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: >32	MIC: 32	MIC: 4	MIC: 2	MIC: 128	MIC: 4	MIC: >16	MIC: >256	MIC: 4
P1547 (P15)	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: >32	MIC: >32	MIC: >32	MIC: >8	MIC: >128	MIC: >32	MIC: >64	MIC: >256	MIC: 32
GoM7	<i>Pseudomona sp/</i>	MIC: 4	MIC: 2	MIC: 2	-	-	-	-	MIC: 16	MIC: 4
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	MIC: 0.008-0.06	MIC: 0.006-0.25	MIC: 0.03-0.12	MIC: 0.004-0.016	MIC: 0.5-4	MIC: 0.25-1	MIC: 0.08-0.5	MIC: 1-4	MIC: 0.25-2
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 0.12-1	MIC: 1-4	MIC: 1-4	MIC: 0.25-1	MIC: 1-4	MIC: 0.5-2	MIC: 1-4	MIC: 1-8	MIC: 0.5-4
Parámetro de susceptibilidad CLSI		≤2 4 8 ≥ S I R	≤2 4 8 ≥ S I R	≤4 8 16 ≥ S I R	≤1 2 4 ≥ S I R	≤16 32 64 ≥ S I R	≤4 8 16 ≥ S I R	≤8 16 32 ≥ S I R	≤16 64 128 ≥ S I R	≤2 4 ≥ S R
						Resistente (R)	Intermedi o(I)	Sensibles (S)		

**Figura 9. Concentración mínima inhibitoria de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de ambientes clínicos.** Los aislados que no pudieron crecer en presencia del antibiótico a la concentración más baja, se reportan con guión (-). El parámetro de clasificación muestra los rangos de R (Resistente), I (intermedio), S (sensibles) reportados por el CLSI para los aislados de *Pseudomonas*, cada rango de susceptibilidad tiene diferentes concentraciones según el antibiótico correspondiente. En la parte inferior se muestran los parámetros de susceptibilidad reportados para aislados de *Pseudomonas* por el CLSI. Antibióticos probados: MEM: Meropenem; IPM: Imipenem; NOR: Norfloxacin; CIP: Ciprofloxacino; AMK: Amikacina; GEN: Gentamicina; CAZ: Ceftazidima; PIP: Piperacilina; CST: Colistina. Todas las MIC que se reportan con un signo (>) quiere decir que la concentración es mucho mayor que las concentraciones reportadas por el CLSI.

Estos resultados nos permiten observar, que las bacterias que se llegan a encontrar en ambientes clínicos presentan mayores niveles de resistencia a diferentes antibióticos; debido a que posiblemente están expuestas directamente a estos fármacos a concentraciones elevadas en comparación con bacterias aisladas del GoM, ya que la mayoría de estos aislados presentaron una resistencia intermedia y una sensibilidad a los antibióticos ya mencionados, siendo resistentes GM16, GM17 y GM89 a meropenem, el aislado GM33 siendo la única cepa resistente a imipenem y todas sensibles a ceftazidima (Fig.8).

Los aislados P7 (P6103), P8 (P4660), P11 (P1473), P12 (P1483), y P13 (P1503) presentaron una MIC de 32 µg/ml para norfloxacin y una de MIC de 8 µg/ml para ciprofloxacino; catalogados como resistentes, para el antibiótico gentamicina presentaron una MIC de 32 µg/ml y una MIC de 128 µg/ml para amikacina; siendo todos catalogados como resistentes frente a los antibióticos probados (Fig.9). En comparación, ninguno de los aislados del GoM presentó resistencia a estos antibióticos, lo que sugiere que las bacterias presentes en el GoM carecen de determinantes de resistencia a antibióticos de las familias quinolonas y aminoglucósidos (Fig.8). Esto posiblemente se deba a que los aislados del GoM no están expuestos constantemente a estas moléculas antibacterianas, caso contrario a lo que ocurre en ambientes clínicos; donde se utilizan con frecuencia estos medicamentos para tratar infecciones urinarias, infecciones respiratorias e incluso infecciones de transmisión sexual (Cecchini et al., 2015).

Interesantemente, la resistencia a colistina fue mayor en aislados clínicos, con una MIC de:8 µg/ml (Fig.9), en comparación con aislados del GoM, que presentaron una MIC de: 4 µg/ml (Fig.8); siendo todos catalogados como resistentes. Estos perfiles de resistencia posiblemente se deban a la posible existencia de determinantes de resistencia que se puedan llegar a encontrar en los ambientes donde fueron aislados cada una de las cepas.

Por otro lado, también hubo cepas que tuvieron susceptibilidad a los antibióticos probados, por ejemplo, el aislado P-10 presentó sensibilidad a norfloxacin, ciprofloxacino, amikacina y gentamicina y en el caso de P-9, presentó sensibilidad a norfloxacin, ciprofloxacino y gentamicina (Fig.9).

De la misma manera, para abundar en el estudio de la RAM en el GoM se realizaron ensayos de susceptibilidad a antibióticos para algunas cepas que presentaron resistencia a antibióticos de importancia clínica en nuestro ensayo inicial, que no han sido identificadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de caracterización inicial de resistencia a concentraciones de 20 µg/ml de antibióticos correspondientes (Fig.6), se observó que algunas de las cepas no identificadas tenían una remarcada resistencia a los antibióticos colistina y vancomicina; se procedió a determinar la MIC de algunos de estos aislados.

Se seleccionaron los siguientes aislados para determinar la MIC, esto debido a que presentaban resistencia en las pruebas preliminares de caracterización de perfiles de resistencia a 20 µg/ml, para colistina se utilizaron los aislados: GM9, GM11, GM24, GM83 y GM84; utilizando la cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922 (Fig. 10); en el caso de vancomicina se utilizaron los siguientes aislados: GM63, GM83, GM54, GM9 y GM11, utilizando la cepa control *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Estos ensayos se realizaron por triplicado (Fig.11).

AISLADO	Concentración de antibiotico colistina (CST)					MIC
	32 ug/ml	16 ug/ml	8 ug/ml	4 ug/ml	2 ug/ml	
GM9						32
GM11						32
GM24						32
GM83						4
GM84						32
<i>E.Coli</i> ATCC 25922						2
	Inhibición del crecimiento					
	Crecimiento bacteriano					

**Figura.10. Ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) con el antibiótico colistina.** Se observa aislados provenientes del GoM con sus respectivas MIC determinadas. En color verde se observa el crecimiento de la cepa en presencia de diferentes concentraciones del antibiótico probado, en color rosa se observa la inhibición del crecimiento de la cepa probada y en la parte inferior se observa el control utilizado para el experimento.

Los aislados GM9, GM11, GM24 y GM84 presentaron una MIC de 32 µg/ml para el antibiótico colistina, siendo el aislado GM83 el único en presentar una MIC de 4 µg/ml (Fig.10), con base a los parámetros del CLSI, estos aislados se pueden considerar como resistentes a colistina.

AISLADO	Concentración de antibiotico vancomicina (VAN)					MIC
	32 ug/ml	16 ug/ml	8 ug/ml	4 ug/ml	2 ug/ml	
GM63						32
GM83						32
GM54						32
GM9						4
GM11						4
<i>Staphylococcus</i> ATCC 29213						0.5-2
Inhibición del crecimiento						
Crecimiento bacteriano						

**Figura .11. Ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) con el antibiótico vancomicina.** Se observa 5 aislados provenientes del GoM con sus respectivas MIC determinadas. En color verde se observa el crecimiento de la cepa en presencia de diferentes concentraciones del antibiótico probado, en color rosa se observa la inhibición del crecimiento de la cepa probada y en la parte inferior se observa el control utilizado para el experimento.

Para el caso de la vancomicina, se determinó que los aislados GM54, GM63 y GM83 presentaron una MIC de 32  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que los aislados GM9 y GM11 presentaron una MIC de 4  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.11). Comparando con *Staphylococcus aureus* ATCC 29223, podemos sugerir que los aislados del GoM analizados son resistentes al fármaco vancomicina; sin embargo, se tiene que identificar el género y la especie de estos aislados para corroborar la veracidad de estas afirmaciones (Fig.11).

Debido a que los aislados GM9 y GM11 presentaron perfiles de resistencia al antibiótico ampicilina dentro de las pruebas de caracterización de perfiles de resistencia a concentraciones de 20  $\mu\text{g/ml}$ , se decidió seleccionar las cepas GM9 y GM11 para realizar ensayos de MIC de antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Se utilizaron los siguientes 4 antibióticos pertenecientes al grupo de los  $\beta$ -lactámicos: meropenem (carbapenems), ampicilina y oxacilina (penicilinas) y ceftazidima (cefalosporina 3<sup>a</sup> generación). Se utilizó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 para la validación del experimento (Fig.12).

Aislados	32 ug/ml	16 ug/ml	8 ug/ml	4 ug/ml	2 ug/ml	Inoculo de crecimiento	MIC	
GM11							-	Meropenem
GM9							-	
E.coli ATCC 27853							0.008-0.06	
	32 ug/ml	16 ug/ml	8 ug/ml	4 ug/ml	2 ug/ml	Inoculo de crecimiento		
GM11							32	Ampicilina
GM9							32	
E.coli ATCC 27853							4 (2-8)	
	32 ug/ml	16 ug/ml	8 ug/ml	4 ug/ml	2 ug/ml	Inoculo de crecimiento		
GM11							16	Ceftazidima
GM9							16	
E.coli ATCC 27853							0.06-0.5	
	32 ug/ml	16 ug/ml	8 ug/ml	4 ug/ml	2 ug/ml	Inoculo de crecimiento		
GM11							-	Oxacilina
GM9							-	
Control de esterilidad							-	
	Inhibición del crecimiento					Resistente	≤16	
	Crecimiento bacteriano					Sensible	≥4	

**Figura.12. Ensayo de concentración mínima inhibitoria utilizando antibióticos β -lactámicos.** Se muestra un ensayo de MIC utilizando 4 antibióticos: meropenem, ampicilina, ceftazidima y oxacilina. En color verde se observa la inhibición del crecimiento y en color amarillo se observa el crecimiento de los aislados GM 9 y GM 11. En color gris se observa la MIC determinada para cada aislado frente al antibiótico probado. El ensayo se realizó por triplicado.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los aislados GM9 y GM 11 presentaron una MIC de 32 µg/ml para ampicilina y una MIC de 16 µg/ml para ceftazidima. Para los antibióticos meropenem y oxacilina no se reportó crecimiento por parte de los aislados ni en las concentraciones más bajas del fármaco (Fig.12). Para el antibiótico oxacilina, no hubo crecimiento de los aislados GM9 y GM11 tanto en las pruebas de caracterización de perfiles como en el ensayo para determinar la MIC. Esto es interesante porque oxacilina y ampicilina pertenecen a la categoría de las pencilinas; sin embargo, los aislados GM9 y GM11 solo presentaron resistencia a ampicilina.

Por último, para el antibiótico ceftazidima, los aislados GM9 y GM11 presentaron una MIC de 16 µg/ml; siendo resistentes al fármaco probado (Fig.9). En las pruebas de caracterización de perfiles de resistencia, estos aislados no presentaron crecimiento para el antibiótico cefoperazona a la concentración de 20 µg/ml (Fig.6). Interesantemente, estos dos antibióticos pertenecen a la clase de cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación, lo cual nos habla de un espectro de acción diferente entre ambos fármacos.

La identificación molecular de todos los aislados del GoM analizados es necesaria para determinar si presentan resistencia intrínseca a los antibióticos que tuvieron efecto o si se podría pensar en una resistencia adquirida.

Estos resultados sugieren que el GoM puede ser un reservorio de determinantes de resistencia a antibióticos.

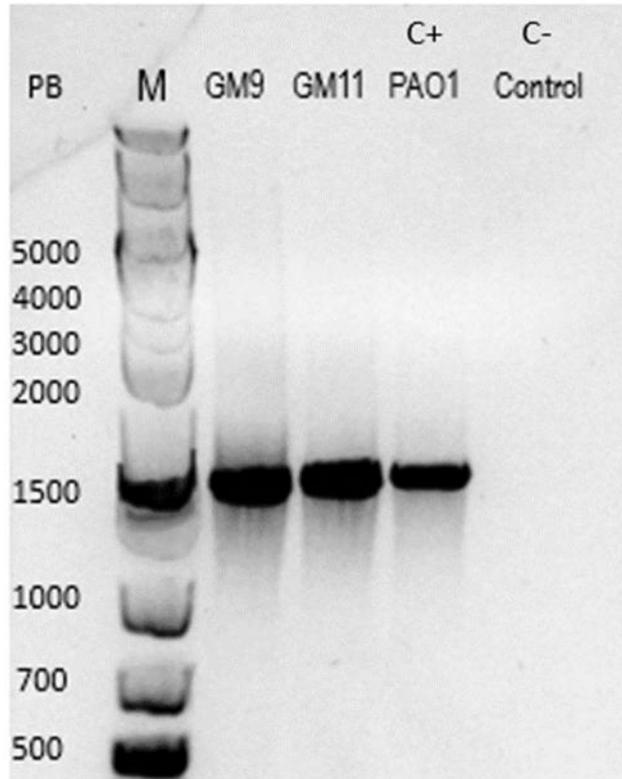
### **Identificación taxonómica de aislados del GoM mediante secuenciación del gen rRNA 16S**

Considerando los resultados obtenidos, se decidió seleccionar a las cepas GM9 y GM11 para la identificación molecular. Esto debido a que presentaron resistencia los antibióticos colistina, ampicilina y ceftazidima.

Se procedió a realizar la extracción del DNA de estos dos aislados. Una vez purificado el DNA, se realizó la cuantificación del este en el equipo NanoDrop™ 1000. Los valores obtenidos para el aislado GM11 señalan una concentración de 58.4 ng/  $\mu$ L, con un índice de pureza 260/280 de 1.75. Para el caso de la GM9 se obtuvo una concentración de 196.5 ng/  $\mu$ L, con un índice de pureza 260/280 de 1.92.

Una vez cuantificado el DNA, se realizó un PCR punto final para la amplificación del gen rRNA 16S, utilizando los oligonucleótidos 16s-rP2 y 16s-fD1 (Tabla 3). Se hizo un gel de agarosa al 0.8% en el cual se observó que el tamaño del producto de PCR fuera el adecuado, aproximadamente de 1,500 pares de bases (Fig.13).

Se utilizó a la cepa PAO1 como control positivo tanto para los ensayos de purificación de DNA como para la amplificación de material genético (PCR), además se utilizó un control negativo (mix sin DNA) dentro del ensayo de PCR mencionado con anterioridad.



**Fig. 13. Amplificación del gen *rRNA 16s* de las cepas GM9 y GM11.** Productos de PCR de la amplificación del gen *rRNA16s* usando como molde DNA cromosomal de las cepas GM9, GM11, PAO1(control positivo +) y control negativo - (reacción sin DNA). El tamaño esperado para los productos de PCR es de 1500 PB (pares de bases) aproximadamente. Se observa también el marcador molecular GeneRuler 1kb Plus DNA.

Una vez que se analizaron los productos de PCR en el gel de agarosa, estos se purificaron con el kit de purificación DNA Clean & Concentrator (Zymo research). Posteriormente, los productos de PCR de los aislados GM11 y GM9 se mandaron a secuenciar en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La secuencia obtenida se visualizó con el software de snapgene (SnapGene®, 2021) y se analizó en el servidor EZBioCloud (Yoon et al., 2017).

	Nombre taxonómico	Número	Similitud	Variación	Nombre filogenético	Complementariedad
GM11	<i>Staphylococcus hominis</i>	DSM 20328(T)	99.90	1/961	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Staphylococcaceae;Staphylococcus;Staphylococcus hominis	100.0
GM9	<i>Staphylococcus hominis</i>	DSM 20328(T)	84.47	123/792	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Staphylococcaceae;Staphylococcus;Staphylococcus hominis	100.0
	<i>Staphylococcus borealis</i>	51-48(T)	84.22	125/792	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Staphylococcaceae;Staphylococcus	100.0
	<i>Staphylococcus pragensis</i>	NRL/St 12/356(T)	84.20	125/791	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Staphylococcaceae;Staphylococcus	100.0
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	MTCC 3383(T)	84.09	126/792	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Staphylococcaceae;Staphylococcus	100.0

**Fig.14. Identificación taxonómica de los aislados GM11 y GM9.** Porcentaje de similitud (%) de cada una de las cepas identificadas dentro de la base de datos de EZBioCloud para los aislados correspondientes.

Con el servidor EZBioCloud se pudo identificar que el aislado GM11 posiblemente sea *Staphylococcus hominis*, con un porcentaje de similitud de bases nucleotídicas de 99% y una complementariedad del 100%, la cual determina la integridad de las secuencias del gen RNA16s obtenidas de las cepas aisladas del GoM comparadas con las secuencias presentes en el servidor. En el caso del aislado GM9 se identificó un porcentaje de similitud del 84% para especies *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus borealis*, *Staphylococcus pragensis* y *Staphylococcus haemolyticus*, con un porcentaje de complementariedad de 100%. Se necesita realizar una secuenciación completa del genoma del aislado GM9 para determinar realmente a qué especie pertenece (Fig.14). Estos resultados son interesantes, ya que *Staphylococcus hominis* es una especie patógena oportunista que presenta resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, lo cual concuerda con los perfiles de resistencia que encontramos para la cepa GM11 (Fig.12).

## VIII. Discusión

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming, existe una gran preocupación por la aparición de bacterias multi-resistentes a antibióticos que son utilizados para tratar enfermedades infecciosas tanto en animales como en humanos.

El estudio de bacterias resistentes provenientes del ambiente terrestre y marino ha ido en aumento en los últimos años, desde la identificación de bacterias ambientales resistentes a antibióticos provenientes del permafrost en la Antártida (D'Costa et al. 2011), hasta la identificación de bacterias que fueron aisladas de una cueva que estuvo aislada durante 4 millones de años (Bhullar et al., 2012). Además, algunos de estos estudios se han centrado en el ambiente marino, reportando un aumento en la resistencia bacteriana a tetraciclinas, aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, sulfonamidas y quinolonas en bacterias aisladas de escamas de peces que habitan el mar de China oriental (Hong et al., 2018), siendo los ecosistemas marinos lugares propicios para la diseminación de estos determinantes de resistencia.

En los ecosistemas marinos se ha reportado una gran biodiversidad de bacterias que habitan estos nichos ecológicos, donde existe una fuerte presión de selección para las bacterias generada por los altos niveles de competencia, tanto por el espacio como por nutrientes. Así mismo, los microorganismos de ambientes naturales presentan una diversidad metabólica y fisiológica que les permite sobrevivir y proliferar en estos ambientes (Acevedo Barrios, 2015). Diferentes características ambientales y antropogénicas que afectan los ambientes marinos influyen en la supervivencia bacteriana, así como en el desarrollo de mecanismos de resistencia a diversos antimicrobianos (Cox & Wright, 2013).

El GoM es un mar semi-cerrado que no tiene salida al mar completamente, es el noveno cuerpo de agua más grande del mundo, presenta conexión con el Océano Atlántico por el Estrecho de Florida y el Mar Caribe por la península de Yucatán. De este ecosistema existen muy pocos estudios acerca de su ecología y acerca de los factores antropogénicos que lo han afectado durante los últimos años (Lipp et al., 2002).

En los últimos años se han realizado estudios metagenómicos con la finalidad de poder identificar las bacterias que habitan el GoM, destacando principalmente la presencia de bacterias de ecosistema naturales y bacterias patógenas provenientes de ambientes antropogénicos. Hoy en día, no se sabe si estas bacterias patógenas son una amenaza para la salud humana (Escobedo-Hinojosa & Pardo-López, 2017). Además, los estudios acerca del fenómeno de resistencia a antibióticos en el GoM son nulos.

Para investigar esto, determinamos perfiles de resistencia a antibióticos en una colección de cepas aisladas en el GoM. Nos proporcionaron 89 provenientes del GoM, de estos aislados solamente 62 pudieron crecer en medio LB a 37°C durante 16 hrs, por lo cual estas 62 cepas se seleccionaron para los análisis posteriores.

La determinación de perfiles de resistencia de 62 aislados del GoM se realizó inicialmente probando una concentración de 20 µg/ml de diversos antibióticos de importancia clínica; estudios anteriores muestran que esta concentración es adecuada para determinar la susceptibilidad de bacterias presentes en ambientes naturales (Bhullar et al., 2012). Se determinó que el 55% de las cepas eran resistentes a uno o más antibióticos de uso clínico; interesantemente, algunas de las cepas que fueron resistentes, ya habían sido identificadas como especies patógenas o patógenas oportunistas por el CIGoM. Algunas de estas especies son: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* y *Enterobacter ludwigii*.

La capacidad de supervivencia de estas bacterias patógenas a bajas profundidades en ambientes con una alta competencia bacteriana y una falta de nutrientes es posible gracias a diversos factores antropogénicos y ambientales característicos del GoM. Algunos de los factores ambientales que influyen en la supervivencia de bacterias patógenas son: las corrientes marinas, la temperatura y la salinidad (Wiese & Imhoff, 2019). Las corrientes del GoM están influenciadas por *Loop Current* que es una gran masa de agua, formada gracias a corrientes provenientes del Mar Caribe y el Océano Atlántico. Estas corrientes al entrar en contacto con el GoM permiten la dispersión de bacterias patógenas y ambientales dentro de este ecosistema (Lipp et al., 2002). La salinidad es otro factor que influye en los patrones de distribución y supervivencia bacteriana, ya que solo ciertos microorganismos pueden tolerar un amplio rango de salinidad. La eutrofización es un proceso que se lleva a cabo en el GoM gracias a la descarga de aguas dulces provenientes de ríos, lagunas, ambientes agrícolas y urbanos que permiten el ingreso de nutrientes como fosfatos y nitratos, que a su vez también permiten

la distribución de salinidad y con ello la disminución de ésta en ciertas partes del GoM. Estos factores influyen en la supervivencia de ciertas bacterias patógenas (Escobedo-Hinojosa & Pardo-López, 2017).

Siguiendo con los análisis de caracterización de perfiles de resistencia, se determinó una alta prevalencia de resistencia a oxacilina (21%), ampicilina (27%) y vancomicina (34%). El resistoma del GoM estaría influenciado por la presencia de diversas bacterias ambientales y patógenas que alberga este ambiente, además, las bacterias tienen la capacidad de adquirir y transferir genes de resistencia. Se ha reportado que *Streptomyces orientalis*, una bacteria ambiental que se encuentra en los suelos y que tiene la capacidad de sintetizar el antibiótico vancomicina, tiene la capacidad de conferir resistencia a su propio metabolito secundario e incluso aportar estos genes de resistencia a su resistoma ambiental (Wijesekara, 2017), por lo cual es probable que este tipo de fenómenos estén también sucediendo para otras bacterias en el GoM. Otros factores que podrían estar influenciando la capacidad de estas bacterias para generar resistencia son las concentraciones mínimas sub-inhedoras, ya que muchos antibióticos se pueden llegar a encontrar en el ecosistema a concentraciones muy bajas; debido a los desechos químicos de granjas y hospitales. Estos fármacos pueden ejercer una presión de selección adicional que estaría acompañada de una competencia bacteriana por espacio y nutrientes en el GoM (Cox & Wright, 2013).

Existe una alta prevalencia de resistencia a los antibióticos oxacilina y ampicilina dentro de los análisis iniciales de caracterización de perfiles de resistencia. Estos antibióticos pertenecen a la familia de los  $\beta$ -lactámicos, que son los fármacos más utilizados a nivel mundial para el tratamiento de infecciones bacterianas, tanto en humanos como en animales. Dicha prevalencia de resistencia posiblemente se deba a que estos antibióticos se han utilizado en grandes cantidades en diferentes países; siendo México y Estados Unidos dos de los principales consumidores. Un estudio publicado en el año 2010 destaca el consumo de antibióticos en países latinoamericanos a lo largo de 10 años. México fue uno de los mayores consumidores de fármacos antibacterianos, sobrepasando a países como Brasil y Argentina, principalmente en el consumo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en el periodo de 1997 a 2007, destacando las cefalosporinas como el fármaco de mayor consumo (Wirtz et al., 2010). En la actualidad, en ambientes clínicos de México el consumo de cefalosporinas es de 35 dosis diarias por 100 estancias (camas), de carbapenémicos el consumo es de 60 dosis diarias por 100 estancias (camas), considerando solo ambientes clínicos (PUCRA, 2018).

En el caso de la vancomicina, ésta se ha utilizado en grandes cantidades principalmente para tratar MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina) en humanos; además, este medicamento también se administra en granjas ganaderas, por ejemplo, hay reportes en los que la avoparcina (análogo de la vancomicina) se ha utilizado en el sur de EUA como promotor de crecimiento y uso profiláctico en aves, cerdos y ganado vacuno (Wijesekara, 2017). Es de esperar que estos fármacos muchas veces lleguen a drenajes o caudales de agua, debido a que puede seguir estando activo en bajas concentraciones al momento de ser excretado del organismo, ya que muchos de ellos no son metabolizados por los organismos. Estos fármacos podrían estar ejerciendo una presión de selección adicional a las bacterias que habitan el GoM, favoreciendo el desarrollo de mecanismos de resistencia a estos fármacos. No hay que olvidar que la vancomicina tiene un origen ambiental, por lo tanto, es de esperarse que los determinantes genéticos para la resistencia a este antibiótico ya estén presentes en el ambiente.

Después de determinar los perfiles de resistencia de los 62 aislados del GoM, se decidió caracterizar con más detalle a los aislados que presentaron resistencia a 3 o más antibióticos. Los aislados que presentan resistencia a una gran variedad de antibióticos probados, han sido identificados por el CIGoM como *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *Pseudomonas sp.* En ese sentido, se determinó la MIC de varios antibióticos a los aislados de *Pseudomonas*. Los antibióticos usados son los recomendados por el CLSI para la determinación de la susceptibilidad en este género.

Los aislados que presentaron mayores perfiles de resistencia fueron *P. aeruginosa* (GM16, GM17, GM21, GM35 y GM89) presentaron resistencia a los antibióticos meropenem, imipenem, piperacilina y colistina.

Las cepas GM16, GM17 y GM21 fueron obtenidas a una profundidad de 55 m, mientras que la GM 89 fue obtenida a 33 m y GM35 fue obtenida a una profundidad de hasta 1000 m; todas aisladas de columnas de agua del GoM. *Pseudomonas* es una bacteria con una versatilidad metabólica impresionante y es capaz de adaptarse a diferentes ambientes incluyendo los presentes en el GoM, por lo que estos resultados no son de extrañar. *Pseudomonas* expresa diversos factores de virulencia que le permiten sobrevivir en diversos ambientes hostiles, incluyendo diferentes organismos hospederos. (Sumita & Fukasawa, 1996). Los metabolitos secundarios de *Pseudomonas* han sido analizados por su potencial actividad antibiótica. También se ha reportado una amplia variedad de mecanismos de resistencia presentes en *P. aeruginosa*, destacando la producción de

carbapenemasas de clase A (genes *GES-19/GES-20*), metalo  $\beta$ -lactamasas de clase B (genes *IMP-18* y *VIM-2*), hiperexpresión de bombas de flujo MexAB-OprM y MexEF-OprN o incluso mutaciones que permiten la inactivación en la porina OprD ( Vignoli & Seija, 2000; Moreno et al., 2009; Nikolaidis et al., 2014). Estos factores generan resistencia a antibióticos como meropenem, imipenem, piperacilina y otros muchos  $\beta$ -lactámicos. Es necesario estudiar si la resistencia a estos antibióticos presentada por los aislados del GoM es mediada por factores similares o diferentes a los ya descritos para *P. aeruginosa*. Los mecanismos de resistencia a colistina en *P. aeruginosa* se deben principalmente a alteraciones en la membrana externa, una reducción en la expresión y síntesis de LPS, así como una reducción en el contenido de iones calcio y magnesio en la envoltura celular y por último alteraciones en los lípidos proteicos encargados de la unión de la colistina. Los determinantes de resistencia a colistina pueden ser adquiridos tanto cromosómicamente como a través de plásmidos. Es por ello por lo que *P. aeruginosa* se considera una de las bacterias con mayor plasticidad para resistir el efecto inhibitorio de antibióticos (Cox & Wright, 2013; Loose et al., 2020).

Con la finalidad de poder comparar los resultados obtenidos de las cepas de *P. aeruginosa* del GoM, se obtuvieron también perfiles de resistencia a antibióticos en aislados clínicos de esta bacteria. Los aislados clínicos de *P. aeruginosa* se obtuvieron de pacientes hospitalizados por quemaduras que fueron tratados con antibióticos para la prevención de infecciones, particularmente los aislados presentaron perfiles de resistencia a todos los antibióticos que se probaron. Posiblemente el lugar del aislamiento podría explicar los altos niveles de resistencia que se reportan en cada una de las cepas, debido a las condiciones presentes en los hospitales donde el uso de antibióticos es muy frecuente.

En ese sentido, se necesitan realizar pruebas de MIC con más de los antibióticos recomendados por el CLSI para obtener un perfil de resistencia a antibióticos más completo tanto para las cepas del GoM como para los aislados clínicos.

Los aislados clínicos de *P. aeruginosa* tuvieron MIC de resistencia más altas que las de las cepas del GoM, esto debido a que las cepas clínicas tienen una mayor exposición a los antibióticos. Sin embargo, es interesante destacar que incluso las cepas del GoM que no están en contacto directo con antibióticos de uso clínico, tienen la capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia a estos. Estas cepas del GoM fueron aisladas de columna de agua, lo que quiere decir que podrían dispersarse a diversas zonas del GoM o incluso del planeta, ya que las corrientes marinas provenientes del Mar

Caribe no se limitan a la entrada del GoM si no que desembocan en el Océano Atlántico, que de igual forma se ve influenciado por otras corrientes marinas (Lipp et al., 2002).

Con el fin de extender el análisis de la RAM en el GoM, se determinó la MIC a algunos aislados no identificados. Se utilizó colistina como uno de los antibióticos a evaluar en estos ensayos, debido a que los aislados presentaron resistencia al fármaco en las pruebas preliminares de caracterización de perfiles de resistencia. Se determinó que los aislados del GoM analizados presentan resistencia a colistina. Existen distintas explicaciones del porqué estas cepas presenten resistencia a colistina. Una de las más probables es que estas cepas pertenezcan a algún género ambiental que presente resistencia intrínseca a este antibiótico; los géneros *Providencia spp*, *Proteus spp* o *Morganella morganii* son bacterias ambientales que se pueden aislar del agua y suelo y que se ha reportado que presentan resistencia intrínseca a colistina (Gogry et al, 2021). Interesantemente, *Proteus mirabilis* y *Morganella morganii* son especies bacterianas que están presentes en el GoM y forman parte del ecosistema, según estudios metagenómicos de secuenciación masiva (Escobedo-Hinojosa & Pardo-López, 2017). Se necesita identificar el género y especie para estos aislados del GoM con la finalidad de proponer si la resistencia a colistina es intrínseca o adquirida. Otra explicación a esta problemática de la resistencia a colistina es que los genes *mcr* y sus variantes sean los causantes de la adquisición de resistencia a este antibiótico en los aislados del GoM. Desde su descubrimiento en el 2015, en granjas de cerdos en China, se han reportado varios casos de patógenos resistentes a este fármaco. Incluso bacterias ambientales que se encuentran en ambientes marinos como *Aeromonas spp.* y *Shewanella spp.*, presentan alelos de genes *mcr* en su cromosoma; contribuyendo a la hipótesis sobre que estos genes de resistencia a colistina tienen un origen ambiental y se dispersaron por HGT (Li et al., 2003; Gogry et al, 2021).

En los ensayos realizados se seleccionaron los aislados GM9, GM11, GM24, GM83 y GM84, debido a que estos aislados presentaron perfiles de resistencia a colistina en las pruebas preliminares de concentraciones de 20µg/ml. Los aislados presentaron una MIC de 32 µg/ml con excepción del aislado GM83, con una MIC de 4 µg/ml, que de acuerdo con los criterios del CLSI los clasifica como resistentes, sin embargo, se tiene que abundar en la identificación molecular de los mismos para validar estas afirmaciones. En humanos, la colistina se ha usado como una alternativa de último recurso contra bacterias MDR; sin embargo, en animales de granja este antibiótico se ha utilizado en grandes cantidades para tratar infecciones bacterianas o con fines profilácticos, ocasionando la diseminación de determinantes de resistencia en el ambiente (Sumita & Fukasawa, 1996).

La presencia de genes *mcr* en el resistoma del GoM, sería posible gracias a las corrientes marinas que repercuten en este ecosistema y que ha tenido varias afectaciones ecológicas a lo largo de los años por la contaminación ambiental. Incluso se ha estudiado la estabilidad química de la colistina en medios acuosos, siendo estable este fármaco en agua hasta por 120 hrs con una temperatura máxima de 37°C (Li et al., 2003). Por último, no hay que olvidar que la colistina es un péptido antimicrobiano, los péptidos son moléculas producidas por una gran diversidad de bacterias que incluso tienen la capacidad de producir mecanismos de resistencia a estos péptidos con la finalidad de evitar su propia inhibición (Vignoli & Seija, 2000; Gogry et al, 2021). Los genes involucrados en la inactivación de la colistina pueden ser transferidos a bacterias que habiten un mismo nicho ecológico como el GoM.

Por último, para abundar en el estudio de la RAM en el GoM se seleccionaron los aislados GM9 y GM11 para realizar los ensayos de MIC con los antibióticos oxacilina, ampicilina, ceftazidima y meropenem; debido a que presentaban perfiles de resistencia a ampicilina en las pruebas iniciales de resistencia, además de que mostraron una resistencia intermedia a vancomicina. Asimismo, estos aislados marinos fueron identificados molecularmente mediante la secuenciación del gen rRNA 16S.

Los resultados obtenidos mostraron que el aislado GM9 presentó un porcentaje de similitud del 84% con las especies *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus borealis*, *Staphylococcus pragensis* y *Staphylococcus haemolyticus*, con un porcentaje de complementariedad del 100%. Por este motivo, es necesario realizar la secuenciación completa de su genoma para determinar con exactitud la especie del aislado GM9. Por otra parte, el aislado GM11 se identificó como *Staphylococcus hominis*, con un porcentaje de similitud del 99% y una complementariedad de bases de 100%. Es importante resaltar que los análisis metagenómicos realizados con anterioridad por el CIGoM, no revelaron la presencia de esta especie bacteriana en el GoM (Escobedo-Hinojosa & Pardo-López, 2017).

A pesar de esto, la identificación presuntiva de estos aislados como *Staphylococcus hominis* es importante, ya que esta es una bacteria patógena oportunista que se encuentra en las mucosas nasales y en la piel. Se ha reportado que este patógeno tiene una gran capacidad de generar resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, principalmente a la meticilina (pertenece a la categoría de penicilinas). Esto se debe principalmente a la HGT de elementos genéticos móviles como los integrones que contienen genes *mecA* y sus variantes (Szczuka et al., 2018); la presencia de este tipo de determinantes de resistencia podría explicar que el aislado GM11 sea resistente a la ampicilina e

incluso a la ceftazidima, ya que estos dos antibióticos presentan el mismo mecanismo de acción, teniendo las cefalosporinas un espectro de acción más amplio (Wijesekara, 2017; Loose et al., 2020).

Además, es posible que el resistoma ambiental del GoM sea un factor clave en la diseminación de diversos genes de resistencia, en los que diversas bacterias puedan aportar o adquirir este tipo de genes. Incluso *Staphylococcus hominis* se ha reportado como un reservorio potencial de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en ambientes hospitalarios (Wijesekara, 2017). Esta problemática de resistencia en el GoM se vería influenciada por concentraciones mínimas sub-inhedorias de antibióticos provenientes de ambientes antropogénicos (Szczuka et al., 2018). Las cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación como la cefepizona y la ceftazidima no se recomiendan para cocos Gram-positivos debido a una menor actividad frente a estos patógenos, en comparación con Gram-negativos, donde se utilizan estos antibióticos con mayor frecuencia debido a su espectro de acción (Calvo & Martínez, 2009). Siendo las cefalosporinas de primera generación ideales en la caracterización de perfiles de resistencia en *Staphylococcus hominis*.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, los aislados GM9 y GM11 presentaron una resistencia intermedia a vancomicina. Por lo tanto, es posible que las concentraciones en las que se puede llegar a encontrar este antibiótico en el GoM, no sean tan elevadas; sin embargo, concentraciones mínimas sub-inhedorias podrían ocasionar la generación de un fenotipo de resistencia frente a este antibiótico (Loose et al., 2020).

Para finalizar, los aislados GM9 y GM11 tuvieron una MIC de 32  $\mu$ g/ml para el antibiótico colistina, gracias a la identificación de estos aislados como *Staphylococcus* spp. y *Staphylococcus hominis* podemos determinar que estos aislados no son resistentes, ya que el antibiótico colistina tiene un mecanismo de acción que afecta la membrana externa de bacterias Gram-negativas, por lo tanto, no pueden ejercer un efecto inhibitorio frente a bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus* (Loose et al., 2020).

En conclusión, nuestros resultados apoyan que las condiciones ambientales, la presencia de un resistoma ambiental, la competencia bacteriana que está ligada por la falta de espacio y recursos nutrimentales, así como las actividades antropogénicas, pueden ser factores que han favorecido el desarrollo de mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias del GoM. Por lo tanto, es necesario seguir evaluando el fenómeno de la RAM en este ambiente del GoM, con el fin de conocer el riesgo para la salud humana que representarían bacterias patógenas resistentes a antibióticos de uso clínico.

## IX. Conclusiones

- En el GoM existen bacterias resistentes a antibióticos
- De las 62 cepas evaluadas, el 55% fueron resistentes a uno o más antibióticos y 45% fueron sensibles a todos los antibióticos probados.
- Todos los aislados del GoM pertenecientes al género *Pseudomonas* presentaron resistencia intermedia a meropenem.
- Todos los aislados del GoM pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron resistentes a colistina.
- El aislado GM9 se identificó presuntivamente como *Staphylococcus* spp. con base en la secuencia del gen rRNA 16S.
- El aislado GM11 se identificó presuntivamente como *Staphylococcus hominis* con base en la secuencia del gen rRNA 16S.
- Los aislados GM11 y GM9 son resistentes a ampicilina y ceftazidima.
- Los aislados GM11 y GM9 presentaron resistencia intermedia a vancomicina.

## X. Perspectivas

- Identificar las bacterias restantes que presentaron resistencia a antibióticos.
- Secuenciar los genomas e identificar los determinantes de resistencia a antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas del GoM.
- Secuenciar los genomas, identificar a nivel de especie e identificar los determinantes de resistencia antibióticos de los aislados GM11 y GM9 del GoM.
- Determinar la MIC de los antibióticos establecidos por el CLSI para el género *Staphylococcus*, en los aislados GM11 y GM9.

## XI. Referencias

- Abushaheen, M. A. et al. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease a Month* 1–21.
- Acevedo Barrios, R. L., Severiche Sierra, C. A. & Jaimes Morales, J. del C. (2015). Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Prod. Limpia.* 10, 160–172.
- Acuña Leiva, G. (2002). Descubrimiento de la penicilina: un hito de la medicina cómo el azar puede ayudar al científico. *Rev. Méd. Clín. Condes* 13, 30–34.
- Allen, Heather K., Donato, J., Wang, H., Cloud-Hansen, K., Davies, J. y Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 251–259
- Adebisi, Y. A. et al. (2021). COVID-19 and Antimicrobial Resistance: A Review. *Infect. Dis. Res. Treat.* 14, 13-15.
- Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., & Spellberg, B. (2013). Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics. *Clin. Infect. Dis.*, 56 (10), 1445–1450.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13(1), 42–51.
- Bhullar, K. et al. (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 7, 1–11.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 27(1), 44–52.
- Cecchini, M., Langer, J., & Slawomirski, L. (2015). *Antimicrobial resistance in G7 countries and beyond: economic issues, policies and options for action.* OECD. Recuperado de : <https://www.oecd.org/els/health-systems/Antimicrobial-Resistance-in-G7-Countries-and-Beyond.pdf>
- Centers for Disease Control & Prevention (CDC). (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019.* NCEZID ( U.S.). Recuperado de: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
- Cisneros Herreros, J. M., & Peñalva Moreno, G. (2018). La crisis de los antibióticos: profesionales sanitarios, ciudadanos y políticos, todos somos responsables. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 36(5), 259–261.
- Clinical and laboratory standards institute. (2017). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* NCCLS, 950 West Valley Road, Suite 2500. Recuperado de: [https://clsi.org/media/1469/m100s27\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf)
- Szczuka, E., Krzymińska, S., Bogucka, N. & Kaznowski, A. (2018) Multifactorial mechanisms of the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* isolated from bloodstream infections. Antonie van Leeuwenhoek, *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 111, 1259–1265.
- Cox, G. & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 287–292

- Consortio de investigación del Golfo de México. (2015). *Proyecto del Fondo de Hidrocarburos de CONACYT/Secretaría de Energía*. Recuperado de: <https://cigom.org/>
- Davies, J. (2009). Darwin and microbiomes. *EMBO Reports*, 10(8), 805–807.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74(3), 417–433.
- Dantas, G. & Sommer, M. O. A. (2012). Context matters — the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 577–582.
- Dcosta, V. M. et al. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 477, 457–461
- Diario Oficial de la federación. (2018). *Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos*. Recuperado de: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018)
- Escobedo-Hinojosa, W., & Pardo-López, L. (2017). Analysis of bacterial metagenomes from the Southwestern Gulf of Mexico for pathogens detection. *Pathog. Dis.* 75(5), 1–9.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2017). Isolating DNA from Gram-negative bacteria. *Cold Spring Harbor Protocols*, 1, 83–84.
- Gross, M. (2013). Antibiotics in crisis. *Current Biology*, 23(24), 1063–1065.
- Gogry, F. A., Siddiqui, M. T., Sultan, I. & Haq, Q. M. R. (2021). Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Front. Med.* 8, 1–19.
- Ghosh, S., Bornman, C. & Zafer, M. M. Antimicrobial Resistance Threats in the emerging COVID-19 pandemic: Where do we stand? *J. Infect. Public Health* 14, 555–560 (2021).
- Hiltunen, T., Virta, M. & Laine, (2017) Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. *Soc. Biol. Sci.* 3.
- Hong, B., Yongbing B., Li, N., Fei, L., Zhaohuan, Z., Haiquan, L., Yingjie, P. y Yong, Z. (2018). A Comprehensive Research on Antibiotic Resistance Genes in Microbiota of Aquatic Animals. *Front. Microbiol.* 9, 1–10.
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.*, 33(3), 300–304.
- Klevens, R. M., Edwards, J. R., Richards, C. L., Horan, T. C., Gaynes, R. P., Pollock, D. A., & Cardo, D. M. (2007). Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. Hospitals, 2002. *Public Health Rep.* 122(2), 160–166.
- Kummerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Antimicrob. Chemother*, 54(2), 311–320.
- Lederberg, J. (2000). Infectious History. *Science*, 288(5464), 287–293.
- Levy, S. B. (2002). Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother*, 49(1), 25–30.
- Lipp, E. K., Huq, A., & Colwell, R. R. (2002). Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Nat. Rev. Microbiol.* 15(4), 757–770.

- Li, J., Milne, R. W., Nation, R. L., Turnidge, J. D. & Coulthard, K. (2003) Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1364–1370.
- Loose, M., Naber, K. G., Coates, A., Wagenlehner, F. M. E. & Hu, Y. (2020). Effect of Different Media on the Bactericidal Activity of Colistin and on the Synergistic Combination With Azidothymidine Against mcr-1-Positive Colistin-Resistant *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 11, 1–8
- Magiorakos, A. P., et al. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). Estructura y funciones de las células microbianas. En Herzong, B. y Wirth R (Eds.), Brock: Biología de los microorganismos (pp. 27–70). Madrid: PEARSON.
- Martens, E., & Demain, A. L. (2017). The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 520–526.
- Marti, E., Variatza, E. & Balcazar, J. L. (2014) The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 22, 36–41
- Martínez-Lopez, B., & Parés-Sierra, A. (1998). Circulation in the gulf of Mexico induced by tides, wind and the Yucatan current. *Ciencias Marinas*, 24(1), 65–93.
- Martinez, J. L. (2008). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science*, 321, 365–367.
- Michiels, J. E., Van den Bergh, B., Verstraeten, N., & Michiels, J. (2016). Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resistance Updates*, 29, 76–89.
- Morales Araya, M. del C. (1985). Antimicrobianos: una revisión sobre mecanismos de acción y desarrollo de resistencia. *Acta Médica Costarricense*, 28(2), 79–83.
- Moreno M, C., González E, R. & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev. Otorrinolaringol.* 69, 185–192.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 95–99.
- Neill, J. O. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *HM Government*. Recuperado de: <https://amr-review.org/>
- Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S., & Dessen, A. (2014). Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein Science*, 23(3), 243–259.
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*. Recuperado de: [http://www.who.int/foodborne\\_disease/resistance/cia/en/#.UiMEZ7zmSDA](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/#.UiMEZ7zmSDA).
- Paredes, F., & Roca, J. J. (2004). Acción de los antibióticos. *OFFARM*, 23(3), 116–124.
- Plackett, B. (2020). Why big pharma has abandoned antibiotics. *Nature* 586, S50–S52.

- Perry, J., Waglechner, N. & Wright, G. (2016). The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, 1–8
- Podolsky, S. H. (2018). The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Communications*, 4(1), 1–8.
- PUCRA. (2018). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: [http://www.puis.unam.mx/slider\\_docs/reporte-ucradigital.pdf](http://www.puis.unam.mx/slider_docs/reporte-ucradigital.pdf)
- Quiroz-Santiago, C., Rodas-Suaréz, O. R., Vázquez, C. R., Fernández, F. J., Quiñones-Ramírez, E. I., & Vázquez-Salinas, C. (2009). Prevalence of Salmonella in Vegetables from Mexico. *J. Food Prot.* 72(6), 1279–1282.
- Roberts, RR., Hota, B., Ahmad, I., et al. (2009). Hospital and Societal Costs of Antimicrobial Resistant Infections in a Chicago Teaching Hospital: implications for Antibiotic Stewardship Clinica. *Infect Dis.* 49:1175-84
- Sumita, Y. & Fukasawa, M. (1996). Meropenem resistance in pseudomonas aeruginosa. *Chemotherapy.* 42, 47–56
- Sengupta, S., Chattopadhyay, K. M., & Grossart, P. H. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–13.
- SnapGene® .(2021). Show or Hide Sequences Aligned to a Reference Sequence. Recuperado de: <https://www.snapgene.com/>
- Van Dam, V., Orlachs, N., & Breukink, E. (2009). Specific Labeling of Peptidoglycan Precursors as a Tool for Bacterial Cell Wall Studies. *ChemBioChem*, 10(4), 617–624.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T Community*, 40(4), 277–283.
- Vignoli, R., & Seija, V. (2000). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Bacteriología y Virulogía Médica.* 649–662.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703
- Wirtz, V. J., Dreser, A. & Gonzales, R. (2010). Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. *Rev. Panam. Salud Pública/Pan Am. J. Public Heal.* 27, 219–225.
- Wijesekara, P. N. K., Kumbukgolla, W. W., Jayaweera, J. A. A. S. & Rawat, D. (2017). Review on usage of vancomycin in livestock and humans: Maintaining its efficacy, prevention of resistance and alternative therapy. *Vet. Sci.* 4, 1–11
- Wiese, J. & Imhoff, J. F. (2019). Marine bacteria and fungi as promising source for new antibiotics. *Drug Dev. Res.* 80, 24–27.
- Yang, Y. et al. (2019) Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environ. Int.* 123, 79–86.

Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S *rRNA* gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. Syst. Evol. Microbiol.* 2017;67(5):1613-1617.



Cuernavaca, Morelos a 24 de agosto de 2022

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **JAVIER CASTAÑEDA DÍAZ**, con el título del trabajo: **Determinación de perfiles de resistencia a antibióticos de bacterias aisladas del Golfo de México.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: M. EN B. LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO

\_\_\_\_\_

VOCAL: M. EN C. LUIS EMMANUEL ROMERO GONZÁLEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. LILIA MONTOYA LORENZANA

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES

\_\_\_\_\_

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**DEYANIRA PÉREZ MORALES** | Fecha:2022-08-24 20:05:54 | Firmante

uZQonXdH7Xy+2LvV3qN9aqmMM+s1csE9PsRw9duUQPMfcTFPFNvirOaEYqQnKnheEaOxGc84ZWiJE8S1bJROHv4+HNsbs1reolv2mAK/UzS4SXfjZdztdLXHygnR96GGscfn1Jk8t/Khw4x7gXs2nM7Lpob+9kHq4L0is/6uV/Gdf6G8jrsvYRrhOr2lIfF8eGYqMc6OXY+646PLqJ3Z5HjJcKzdeZGXjKksKIDZ8sDmRStoqWU75/qfDL2D6zVgviN1PRP5FpcWujUeNsHRNEG03NFT5L+vX48b7HzmV/kwH/W5aSZLnGeliBMGRdiajaQ+JdkCz/0QnMZsg==

**LILIA MONTOYA LORENZANA** | Fecha:2022-08-24 21:55:45 | Firmante

ibk6hiztdBl/PywnWKTH1d6Dm7VfO9HucUpPCjmxwWwU34P4zmP+hm/wTNinkX/UD134y2CSKbDtYvmJp+E3ByhN8oKDXkJhd21JKceJg3MS9DMjWxXhtbXZ7mEqiDnr4bvlHRNXmP5VeoPjfq+23UCjgnvOtkTG6UpZ6uha5SAaa77xvBWeecJxYMst4ZxfBO89P1F9/cSTs20A5DqnKnmz3cVymUuszmlm0UcZrRfKbpAZyVopEZVhCBNYyNtcWN+iChMLIAkYajVNUi7va7sQ2at935Lr4wR7eYic8Tdkl3necZMM+p0kspY8IWzW21vFV+dAlcGULqd+gxOb0Rw==

**LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO** | Fecha:2022-08-25 08:06:47 | Firmante

Fk6g2dg+NBebLgVcq8Me8tDM8zENNoY16Hd8V8EOoYeMip5SSkinOFwulMLBqrt6iS3kV46uKELRvOwQUGaYwYc6T/7LHbyEyo1dO97ato58+L6PvhYQSJnxOexauBWbyUZZ3bwTliURMcpgY5SL1swGs8/QOH5JwHzPXG3naVvJbGt+td+coVDzy+3yLuujja4vS3dzoK9V0s6UM7Y3P0wZ4D9147PpXT1trYSAghkvidvcs+HswWF9u42NMHloLMKv58cpBHKnzAS2odgFAHbSEOXPybDuXtru8h7JKhpLqbQ7ri1HW2F5tKVAicVMtH+MFLIIIHXJgcTvG9Ng==

**LUIS EMMANUEL ROMERO GONZÁLEZ** | Fecha:2022-08-25 09:17:20 | Firmante

mH7eZD1MzLFmDLxQzP3uWWWQFFik6jWxV6OEJFZZ3GWpFB6UgNpvyNHenFwv1K5aYHvKxqYGHnj2uVyLSUIMDmXabbQAW0lwRUv4jXRh6HX4p3BtNn0XR8Yb+7gjh64UFxZ9Is094mg3RnqRmAzF9tLdpVJq2dOI7pyeAz23N3UbgBliz7K49axxNCMq2/oPXVpYkRuJMN3z56vR55PEv0WZ7TunqoY1+p69API+YyIkBx6du4CTpxXV+iyWBhUX/1WeV1FhLJGgkFp/97u59r0uWc5jHytoJTJqfnQN6iLu0TNCLFOLe1MEHzUQmQxW4e7i6Ku9eeov4XRxaSA==