

CARACTERIZACIÓN
DE LA DIVERSIDAD
FENOTÍPICA
BACTERIANA Y SU
CONTRIBUCIÓN A
LA RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



-Alumna-

GLORIA SALUD CRUZ GUZMÁN

-Tutora-

MARIA ANTONIA SÁNCHEZ ROMERO

CARACTERIZACIÓN
DE LA DIVERSIDAD
FENOTÍPICA
BACTERIANA Y SU
CONTRIBUCIÓN A
LA RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



GRADO EN FARMACIA

En Sevilla, a 21 de Julio de 2021

Departamento de Microbiología

Revisión Bibliográfica

-Alumna-

GLORIA SALUD CRUZ GUZMÁN

-Tutora-

MARIA ANTONIA SÁNCHEZ ROMERO

ABREVIATURAS EMPLEADAS

- OMS: Organización Mundial de la Salud
- LPS: Lipopolisacárido
- PAP: Perfil de Análisis Poblacional
- UFC: Unidades Formadoras de Colonias
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- E-test: Épsilon test
- MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina
- IRT: Betalactamasas resistentes a los inhibidores
- BLEE: Betalactamasas resistentes a los inhibidores
- URA: Uso Racional de Antibióticos
- PROA: Programa de Optimización de Antibióticos
- PDR: Pan-resistencia
- XDR: Resistencia extensa
- MDR: Resistencia a múltiples fármacos
- KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa
- VIM: Veronase IMipenemase

RESUMEN	5
ABSTRACT	5
PALABRAS CLAVE:	5
OBJETIVOS	6
METODOLOGÍA	6
INTRODUCCIÓN	6
HETERORESISTENCIA: DEFINICIÓN Y CAUSAS	8
MECANISMOS RESPONSABLES DE LA HETERORESISTENCIA	11
1) <i>Ineficacia a los antibióticos</i>	12
2) <i>Crecimiento bacteriano en biofilms</i>	12
3) <i>Cambios en la permeabilidad bacteriana</i>	13
4) <i>Tamaño del inóculo</i>	14
MÉTODOS PARA DETECTAR HETERORESISTENCIA	16
EJEMPLOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	23
<i>Mecanismos de resistencia desarrollados por microorganismos Gram negativos</i>	23
Resistencia a los carbapenémicos	24
Resistencia a quinolonas	27
Resistencia a aminoglucósidos	27
<i>Mecanismos de resistencia desarrollados por microorganismos Gram positivos</i>	27
Resistencia a los beta-lactámicos	27
Resistencia a los macrólidos y a la clindamicina	28
PROBLEMÁTICA ACTUAL Y ESTRATEGIAS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	30
CONCLUSIÓN	35
BIBLIOGRAFÍA	35

RESUMEN

Los antibióticos son los medicamentos que más vidas salvan en la actualidad, no sólo para tratar enfermedades infecciones con origen bacteriano, sino también para prevenirlas en intervenciones quirúrgicas como los trasplantes. Sin embargo, su uso indiscriminado ha causado la aparición de resistencias bacterianas a los antibióticos, siendo cada vez mayor el número de bacterias que muestran resistencia a uno o varios grupos de antimicrobianos. Cuando en una población de bacterias isogénicas existen subpoblaciones de células con diferentes niveles de sensibilidad a un determinado antibiótico, se habla de un tipo de resistencia conocida como heteroresistencia. En este trabajo se profundizará en este tipo de resistencia a antibióticos y el papel de la heterogeneidad fenotípica como un factor que limita la eficacia del tratamiento con antibióticos. El conocimiento de los mecanismos responsables de la resistencia a antibióticos es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan encontrar tratamientos más eficaces contra las infecciones bacterianas.

ABSTRACT

Antibiotics are the drugs that currently save the most lives, not only to treat diseases and infections of bacterial origin, but also to prevent them in surgical interventions such as transplants. However, their indiscriminate use has caused the emergence of bacterial resistance to antibiotics, with an increasing number of bacteria showing resistance to one or more groups of antimicrobials. When in a population of isogenic bacteria there are subpopulations of cells with different levels of sensitivity to a given antibiotic, we speak of a type of resistance known as heteroresistance. In this work, we will study in depth this type of antibiotic resistance and the role of phenotypic heterogeneity as a factor that limits the efficacy of antibiotic treatment. Knowledge of the mechanisms responsible for antibiotic resistance is crucial for the development of new strategies to find more effective treatments against bacterial infections.

PALABRAS CLAVE: resistencia a antibióticos, heterogeneidad fenotípica, heteroresistencia, subpoblación.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre la importancia de la diversidad fenotípica bacteriana y su contribución a la resistencia antimicrobiana. La elección de este tema se debe al gran impacto social y económico que está causando la resistencia a antibióticos en la actualidad. Este trabajo se centrará en los mecanismos no-genéticos implicados en la resistencia a antibióticos y sus consecuencias.

En esta revisión se abordarán distintos puntos que incluyen:

- Descripción de la situación actual.
- Definición de resistencia bacteriana a antibióticos, tipos y causas que la originan.
- Mecanismos que generan resistencia a antibióticos y los métodos utilizados para identificarlas.
- Problemática actual y estrategias futuras para frenar el avance de las resistencias a antibióticos.

METODOLOGÍA

Para la realización de este artículo de revisión bibliográfica se han consultado las siguientes bases de datos: PubMed y Science Direct. También se ha consultado páginas oficiales como Elsevier, Vademecum y Organización Mundial de la Salud (OMS). Así mismo se han consultado trabajos fin de grado y trabajados fin de máster de la plataforma IdUS. Para la búsqueda de información se han usado las siguientes palabras clave: ‘fenotipo’, ‘resistencia’, ‘antibiótico’, ‘heteroresistencia’, ‘mecanismos’, ‘métodos’, ‘estrategia’, sobre todo en inglés. Se ha usado la opción Free Full text, para poder acceder a texto completo.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los antibióticos a principios del siglo XX supuso uno de los mayores avances en la medicina y han salvado millones de vidas. Sin embargo, en la actualidad la aparición de resistencias a antibióticos debido, entre otras causas al uso inadecuado de los antibióticos supone una amenaza mundial.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año mueren 700.000 personas a causa de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos. Estos datos reflejan, por un lado, la necesidad de encontrar nuevos tratamientos que sean eficaces contra bacterias resistentes y, por otro lado, la necesidad de concienciar sobre el uso adecuado de los antibióticos.

La resistencia bacteriana a antibióticos se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibióticos que matan o inactivan a bacterias de la misma especie. Por tanto, las bacterias resistentes sobreviven a concentraciones de antibióticos más altas que las bacterias sensibles.

Los mecanismos utilizados por las bacterias para combatir los compuestos antimicrobianos son clasificados usualmente como: resistencia innata, también conocida como resistencia intrínseca; resistencia adquirida y resistencia adaptativa (Fernández & Hancock, 2012a) (Sánchez-Romero & Casadesús, 2014).

Resistencia innata

La resistencia innata es aquella inherente a la célula. Este tipo de resistente comprende todas las propiedades inherentes proporcionadas por las características de un microorganismo particular que limitan la acción de un antibiótico. Un ejemplo de este tipo de resistencia es la posesión de una membrana exterior semipermeable, que, debido a su baja permeabilidad, dificulte la entrada del antibiótico al interior de la célula (Andersson & Hughes, 2011; Fernández & Hancock, 2012b).

Resistencia adquirida

La resistencia adquirida hace referencia a una población bacteriana que originalmente es susceptible al compuesto antimicrobiano y se vuelve resistente por incorporación de nuevo material genético: plásmidos, transposones o bien como consecuencia de mutaciones (Fernández & Hancock, 2012b). La adquisición de material genético de una bacteria susceptible a antibióticos por parte de una bacteria resistente, ocurre a través de conjugación (contacto entre dos células), transformación (incorporación de ADN desnudo) o transducción (mediante un bacteriófago) (Becerra et al., 2009).

Las mutaciones suelen alterar la acción antibiótica a través de diversos mecanismos, entre los que destacan:

- Modificaciones en el objetivo antimicrobiano

- Disminución en la absorción del fármaco
- Cambios globales en importantes rutas metabólicas a través de la modulación de redes reguladoras.

Resistencia adaptativa

Por último, la resistencia adaptativa se define como un aumento temporal de la capacidad de una bacteria para sobrevivir a un ataque de antibiótico debido a alteraciones en la expresión de los genes o de proteínas como consecuencia a la exposición de condiciones ambientales desencadenantes, como condiciones nutricionales, estrés... (Fernández & Hancock, 2012b).

Los mecanismos de resistencia innata y de resistencia adquirida, son estables y pueden transmitirse verticalmente a las generaciones siguientes, por el contrario, la resistencia adaptativa es temporal (Fernández & Hancock, 2012b).

HETERORESISTENCIA: DEFINICIÓN Y CAUSAS

La mayoría de las células bacterianas de un cultivo líquido son células isogénicas, es decir, células con el mismo genotipo y, por tanto, la misma información genética. Sin embargo, un mismo genotipo no implica necesariamente un mismo fenotipo. De esta forma, en una población bacteriana podemos encontrar células genéticamente idénticas pero que muestran diferente fenotipo, siendo la heterogeneidad fenotípica un fenómeno común en bacterias.

Los estudios sobre los mecanismos de resistencia a los antibióticos se han centrado típicamente en mutaciones genéticas estables o adquisición de genes de resistencia a antibióticos, los cuales confieren resistencia a todas las células dentro de una población. Sin embargo, existe una apreciación cada vez mayor de las formas en que los rasgos fenotípicos expresados por subpoblaciones menores de células pueden afectar la fisiología bacteriana, incluida la resistencia a los antibióticos.

Cuando se estudia la sensibilidad a determinados antibióticos en poblaciones bacterianas con células isogénicas se observa que no todas las células responden de la misma forma (Andersson et al., 2019; Sánchez-Romero & Casadesús, 2014). A este fenómeno se le conoce como heteroresistencia. En este trabajo lo definiremos como “la existencia de subpoblaciones celulares que muestra una resistencia a antibióticos diferente al resto de la población”. El origen de la heteroresistencia puede deberse a mecanismos genéticos

alterando la secuencia del ADN mediante mutación o reorganización del ADN; y/o mecanismos no-genéticos, que pueden ser definidos como “la capacidad de las bacterias de resistir a la acción de los antibióticos sin mutaciones” (Sánchez-Romero & Casadesús, 2014).

La resistencia a antibióticos debida a mecanismos no-genéticos se caracteriza por ser una resistencia inestable, es decir, la bacteria en ausencia de antibiótico puede recuperar la sensibilidad a éste. Al contrario de lo que ocurre con la resistencia a antibióticos por mecanismos genéticos, cuando la existencia de una mutación genera que la bacteria adquiera una resistencia estable (Andersson et al., 2019). Otra característica de los mecanismos no- genéticos es que origina una resistencia adaptativa. La resistencia adaptativa, como se ha explicado anteriormente, implica cambios en la expresión génica inducidos por el medio ambiente, lo que da lugar a un aumento de la capacidad de una bacteria para sobrevivir en presencia de antibiótico (Barbosa & Levy, 2000; Dupont et al., 2004).

Cuando hablamos de heteroresistencia debemos tener en cuenta diferentes factores para determinar y definir el grado de sensibilidad a los antibióticos. El primer factor que debemos tener en cuenta es el origen y procedencia de la población que presenta la resistencia, destacando entre heteroresistencia policlonal o monoclonal. Dos situaciones pueden dar lugar a una heteroresistencia policlonal: la primera sería que tuviera lugar una co-infección con dos clones con diferente grado de resistencia y la segunda es que aparezca una resistencia espontánea a causa del tratamiento con antibiótico. Por el contrario, la heteroresistencia monoclonal, se da cuando en clones aislados y puros se genera de manera espontánea una resistencia en determinadas subpoblaciones (Figura 1).

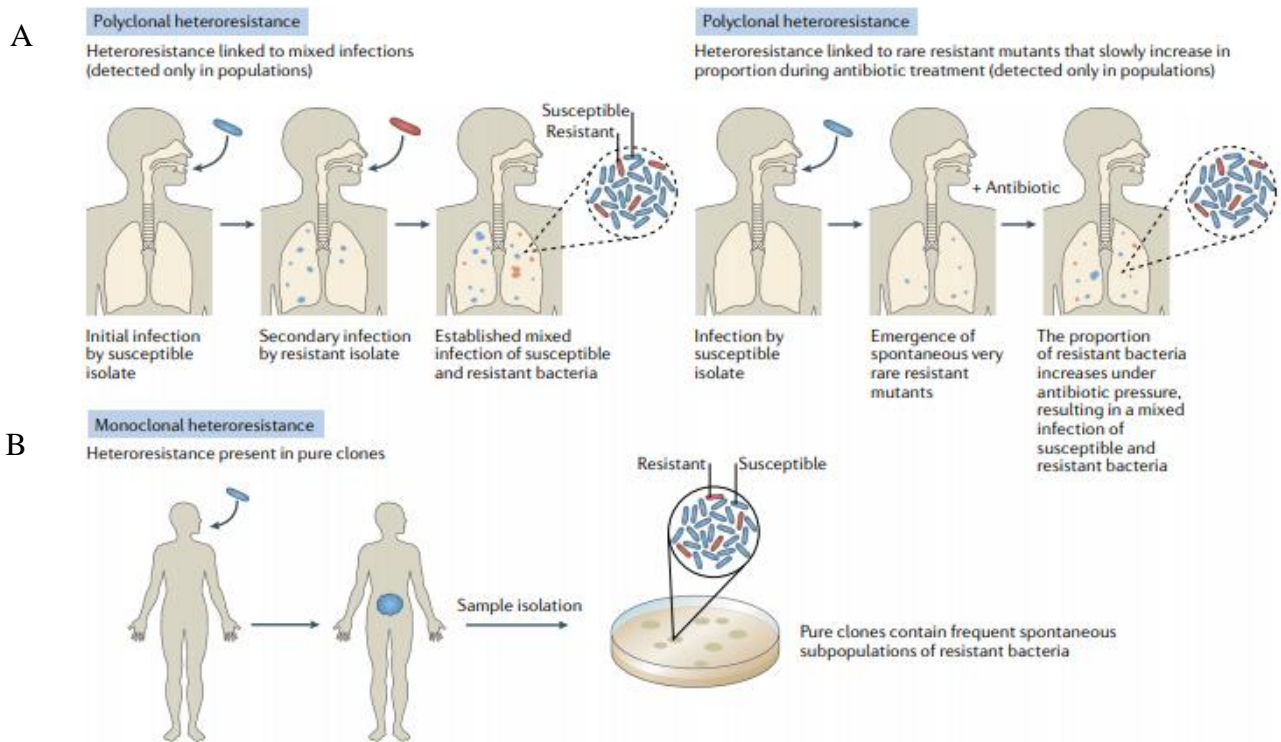


Figura 1. El origen o procedencia de la población bacteriana es un factor importante para definir heteroresistencia.

A. La heteroresistencia policlonal puede originarse por varias causas: que ocurra una infección simultánea con dos clones de diferente nivel de resistencia, o bien, como aparece en la imagen de la derecha, que, tras el tratamiento antibiótico, algunas de las bacterias adquieran resistencia.
 B. La heteroresistencia puede ser monoclonal y se adquiere de manera espontánea (Andersson et al., 2019)

Otro de los factores que debemos estudiar es el nivel de resistencia a los antibióticos, comparando el de la subpoblación en estudio con la población principal.

También debemos estudiar la frecuencia con la que aparece la heteroresistencia, por ejemplo, para *Mycobacterium tuberculosis*, cuando un número de células igual o superior al 1% de la población muestra una resistencia superior al resto, se considera heteroresistencia.

Por último, debemos tener en cuenta la estabilidad del fenotipo de heteroresistencia que se estudia sometiendo a la población a una determinada dosis de antibiótico y observando su comportamiento tras cincuenta generaciones de crecimiento (Figura 2). Decimos que la heteroresistencia es estable si la resistencia no disminuye o desaparece en ausencia de antibióticos, y por el contrario, decimos que es inestable cuando ésta disminuye o desaparece cuando la población no está en contacto con el antibiótico (Andersson et al., 2019)

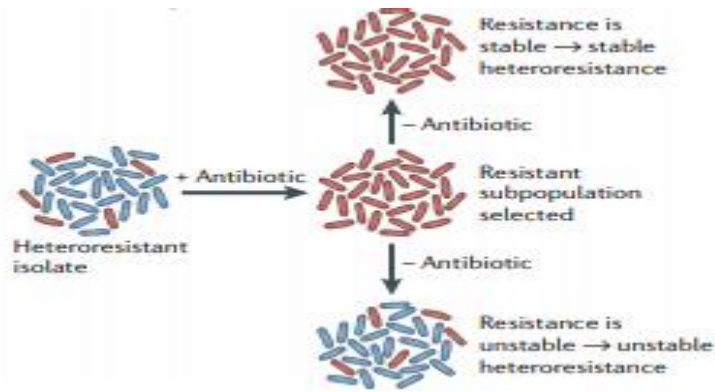


Figura 2. La estabilidad de la población bacteriana es un factor importante para definir heteroresistencia.

Para estudiar la estabilidad de la heteroresistencia, se añade antibiótico a la colonia de bacterias con diferente nivel de susceptibilidad a este fármaco y se retira después de un tiempo. Si al retirar el antibiótico, la resistencia permanece, se dice que la heteroresistencia es estable; si por el contrario, al retirar el antibiótico la resistencia desaparece, se dice que es inestable. (Andersson et al., 2019).

Las causas que pueden originar la resistencia a antibióticos por mecanismos no genéticos son diversas. Una de las principales causas son las condiciones ambientales. Si la bacteria se encuentra en un medio pobre de nutrientes, no crecerá y, por tanto, en estas condiciones una determinada dosis de antibiótico podría acabar con la infección. Sin embargo, en condiciones óptimas y ricas de nutrientes, que permitan una elevada tasa de crecimiento, la misma dosis, será ineficaz para la bacteria. Otra de las causas que pueden originar heteroresistencia por mecanismos no-genéticos son los cambios en la expresión génica debido a que la expresión de ciertos genes puede agravar o debilitar la infección. Otra causa es la activación de mecanismos específicos, por ejemplo, la activación de bombas de flujo que se encarguen de expulsar un determinado compuesto al exterior de la célula. Por ejemplo, ciertas cepas de *Salmonella enterica* son resistentes a quinolonas debido a mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* (factor genético) y el aumento de actividad de las bombas de flujo (factor no-genético) (Miró et al., 2004; Sánchez-Romero & Casadesús, 2014).

MECANISMOS RESPONSABLES DE LA HETERORESISTENCIA

Los mecanismos que conducen a heteroresistencia son muy diversos y conocerlos con detalle podría ayudarnos a establecer nuevas estrategias terapéuticas.

La heteroresistencia o diferencias en cuanto a la susceptibilidad a antibióticos dentro de una población bacteriana puede ser provocada por:

1) Ineficacia a los antibióticos

En algunas circunstancias, la ineficacia de las drogas se produce en las células que están en fase de reposo. Por ejemplo, se ha comprobado que las células sin dividirse son más resistentes a las penicilinas (Lapage, 1945).

Este fenómeno se observó por primera vez para los antibióticos β -lactámicos. Éstos son sólo eficaces para células que están en fase de división, ya que su mecanismo de acción consiste en la inhibición de las síntesis de peptidoglucanos que forman la pared celular en la fase de crecimiento (Luster et al., 1982). Si las células están en fase de reposo, por lo tanto, no están creciendo ni formándose la pared celular. Dichas células no se verán afectadas por la acción de estos fármacos.

Esta situación explica las recaídas de ciertas infecciones una vez que se completa el tratamiento con antibióticos. Con el paso del tiempo, las bacterias que estaban en fase de reposo (resistiendo a la acción del antibiótico β -lactámico), retoman su crecimiento, y, por tanto, aparecen de nuevo los síntomas. (Corona & Martínez, 2013).

Cuando la eficacia del tratamiento depende de la tasa de crecimiento, hay que tener en cuenta dos situaciones. Una de ellas, cuando el crecimiento está restringido, por ejemplo, por ciertos factores ambientales, y otra que puede ocurrir, en infecciones de larga duración, en las cuales los nutrientes se agotan, y la tasa de crecimiento es muy baja.

2) Crecimiento bacteriano en biofilms

El crecimiento de microorganismos adheridos a la superficie se conoce como crecimiento formando biopelículas o biofilm. La formación de biofilm es otra situación donde aparecen resistencias bacterianas al tratamiento con antibióticos.

En primer lugar, la formación del biofilm dificulta la difusión del antibiótico hacia las capas más profundas. Además, ciertos componentes del biofilm atrapan al antibiótico, reduciendo su concentración libre, y por tanto, la concentración eficaz para matarla. En segundo lugar, la situación metabólica de las células que habitan en las distintas capas es diferente. Por ejemplo, la concentración de oxígeno y de nutrientes es superior en las capas superiores que en las capas inferiores (Corona & Martínez, 2013).

Por lo tanto, el crecimiento en biofilm es un medio de protección para las bacterias porque las protege de la acción de los antibióticos (Caldas Arias, 2015).

Por ejemplo, en colonias de *Pseudomonas aeruginosa* que crecen formando biofilm, las regiones aeróbicas, es decir, donde la concentración de oxígeno es adecuada, son susceptibles a quinolonas y resistentes a péptidos catiónicos (en la matriz extracelular del biofilm hay ADN, molécula que quela cationes y provoca que se desencadenen resistencia); sin embargo, en las regiones hipóxicas, que son aquellas con deficiencia de oxígeno, ocurre lo contrario.

Como ya se ha comentado, el crecimiento en biofilm permite a las bacterias desarrollar estrategias que conllevan la aparición de resistencias. Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* se ha comprobado que la respuesta de detección de quorum (QS) desencadena su formación. Por tanto, si se actúa a este nivel e inhibe esta respuesta, se evitará que se forme el biofilm y aumentará la susceptibilidad hacia ciertos antibióticos (Corona & Martinez, 2013).

Otro ejemplo ocurre con la azitromicina que inhibe la formación del biofilm, inhibiendo la síntesis de alginato, uno de los componentes del biofilm. Sin embargo, *Pseudomonas aeruginosa* es resistente intrínsecamente a todos los macrólidos. Para combatirlo se utiliza, un tratamiento combinado entre azitromicina y otro fármaco. La azitromicina ejerce la función de inhibir la formación del biofilm y el segundo fármaco, por ejemplo algún péptido catiónico, ejerce la acción, sobre la bacteria que ya será sensible (Nalca et al., 2006).

3) Cambios en la permeabilidad bacteriana

Para que el antibiótico ejerza su función debe penetrar la envoltura bacteriana. Los cambios en esta envoltura provocarán cambios en la permeabilidad y dificultad para la entrada del antibiótico (Fernández & Hancock, 2012a; Pagès et al., 2008). Las bacterias han desarrollado diferentes estrategias para dificultar la entrada del antibiótico en la célula:

- Una de las causas puede ser la modificación del lipopolisacárido (LPS). El LPS tiene grupos aniónicos que interactúan con los grupos catiónicos del antibiótico, si la modificación provoca una disminución de las interacciones, se dificulta la penetración (Peterson et al., 1985).
- Otro motivo puede ser la formación de vesículas de membranas, que mediante diversos mecanismos podría inducir resistencia. Estas vesículas tienen la capacidad de atrapar el antibiótico y reducir la concentración de antibiótico libre. Además, estas vesículas están

involucradas en la secreción de señales intercelulares y funciones relacionadas con la supervivencia bacteriana. La formación de estas vesículas puede verse incrementada por la limitación de nutrientes y, la temperatura (Manning & Kuehn, 2011).

- En algunas ocasiones, el fármaco no penetra por difusión simple, sino que penetra a través de poros o transportadores que facilitan su entrada. Si disminuye el número de estos poros, la concentración de fármaco en el interior de la célula, será menor (Fernández & Hancock, 2012a). Por ejemplo, *Escherichia coli* presenta dos porinas principales, OmpC y OmpF, las cuales están involucradas en el transporte de antibióticos y, por tanto, su expresión va a influir en la susceptibilidad al tratamiento con estos fármacos. Se regulan de manera inversa; en ambientes de baja osmolaridad y baja temperatura se aumenta la expresión de OmpF y se reduce la de OmpC, al contrario ocurre en ambientes de alta osmolaridad. Como cada una de las porinas tienen sustratos específicos, dependiendo del ambiente se verán afectados unas moléculas de fármacos u otras.

- El número o la actividad de las bombas de reflujo puede aumentar y, el fármaco puede ser expulsado desde el citosol hacia el exterior de la célula. En algunas especies bacterianas, las bombas de flujo pueden llegar a representar el 10% de los transportadores totales (Saier & Paulsen, 2001).

- También es posible que los reguladores metabólicos globales influyan. Por ejemplo, el regulador Crc, que actúa a nivel postranscripcional, está implicado en el metabolismo del carbono en *Pseudomonas aeruginosa*; además modula la virulencia (Linares et al., 2010; Moreno et al., 2009).

4) Tamaño del inóculo

Para estudiar la resistencia a antibióticos de una población bacteriana, es importante tener en cuenta el tamaño del inóculo. A mayor número de bacterias, mayor será la cantidad de antibiótico que se necesita. Además, la concentración mínima eficaz puede ser mayor que la determinada en laboratorio en infecciones de alta carga bacteriana (Corona & Martínez, 2013).

En este sentido, también es importante tener en cuenta que algunas bacterias tienen la capacidad de sintetizar enzimas que inactivan al antibiótico, por tanto, mientras mayor sea el número de bacterias, mayor es la actividad degradadora (Martínez et al., 1994).

5) Mutaciones

Las mutaciones que confieren resistencias a antibióticos son generalmente estables y, por tanto, el fenotipo de resistencia no revierte al fenotipo de susceptibilidad en ausencia de antibiótico. Tales mutaciones incluyen mutaciones puntuales, inserción de secuencias y pequeñas deleciones (Andersson et al., 2019).

La resistencia de *Acinetobacter baumannii* a los carbapenémicos es un ejemplo de resistencia causada por una mutación puntual en un gen que codifica la β -lactamasa. Esta mutación aumenta la actividad de esta enzima. Otro ejemplo sería la resistencia a la colistina de *Klebsiella pneumoniae* que está causada por un codón de parada prematuro (Andersson et al., 2019).

Las secuencias de inserción son pequeños segmentos de ADN que pueden insertarse en una molécula. La rifampicina es un bactericida que interfiere en la síntesis de ARN mensajero al unirse a la ARN polimerasa que está compuesta por cuatro subunidades, codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*. Las micobacterias desarrollan resistencia a este antibiótico, observándose mutaciones en el gen *rpoB*, debidas a inserciones. Además, también se han observado deleciones y mutaciones puntuales (Caws et al., 2006; Kolattukudy et al., 1997; Woychik & Young, 1990).

Un ejemplo de resistencia causada por deleción de una secuencia se puede observar en la resistencia a pirazinamida que muestran algunos microorganismos. La pirazinamida es un bactericida que ejerce su acción gracias a la acumulación de su derivado activo, ácido pirazinoico, que se forma gracias a la acción degradadora de la enzima pirazinamidasa. En los aislados resistentes, se han identificado interrupciones en el gen *pncA*, que codifica la enzima pirazinamidasa (Fontalvo & Gomez, 2014).

6) Amplificación de genes

Las amplificaciones genéticas, son muy inestables y pueden causar resistencia a antibióticos si se originan en genes responsables de la degradación de un fármaco. La resistencia a la colistina de *Salmonella typhimurium*, se debe a amplificaciones en el gen *pmrD*. PmrD es un regulador positivo que regula la transcripción de genes que codifican proteínas que modifican el lípido A, dando esto lugar a un fenotipo de resistencia (Andersson et al., 2019).

MÉTODOS PARA DETECTAR HETERORESISTENCIA

Para definir e identificar heteroresistencia a un determinado antibiótico en una determinada población bacteriana se pueden necesitar varias pruebas. Actualmente existen una diversidad de métodos desde aquellos más laboriosos como el análisis de perfil de población (PAP) hasta otros métodos más sencillos como la observación de halos de inhibición en colonias, empleando discos (Prueba de difusión en discos) o tiras (Epsilon test) (Martínez-Martínez, 2008) (Morosini et al., 2012a).

A continuación, se explicarán con detalle los métodos más utilizados.

El **análisis de perfil poblacional**, conocido como PAP, es considerado el método estándar por excelencia. Consiste en someter a la población de bacterias que crecen en una placa a un gradiente de concentraciones de un determinado antibiótico y cuantificar el crecimiento mediante el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC). La población de bacterias se toma de la muestra del paciente en cuestión (Figura 3). Se considera heteroresistencia en dos casos: i) si la subpoblación resistente aparece con alta frecuencia (superior a 1×10^{-7}) y la concentración que produce la máxima inhibición es ocho veces superior a la concentración máxima tolerada, es decir, la concentración máxima que no causa inhibición del crecimiento bacteriano; o ii) si la concentración mínima eficaz observada en este ensayo es ocho veces superior a la determinada clínicamente para esa familia de bacterias y ese antibiótico (El-Halfawy & Valvano, 2015). Es un método laborioso y más caro que el resto, por lo que únicamente se utiliza para confirmar casos clínicos específicos o cuando existen contradicciones con otros métodos menos precisos (Andersson et al., 2019).

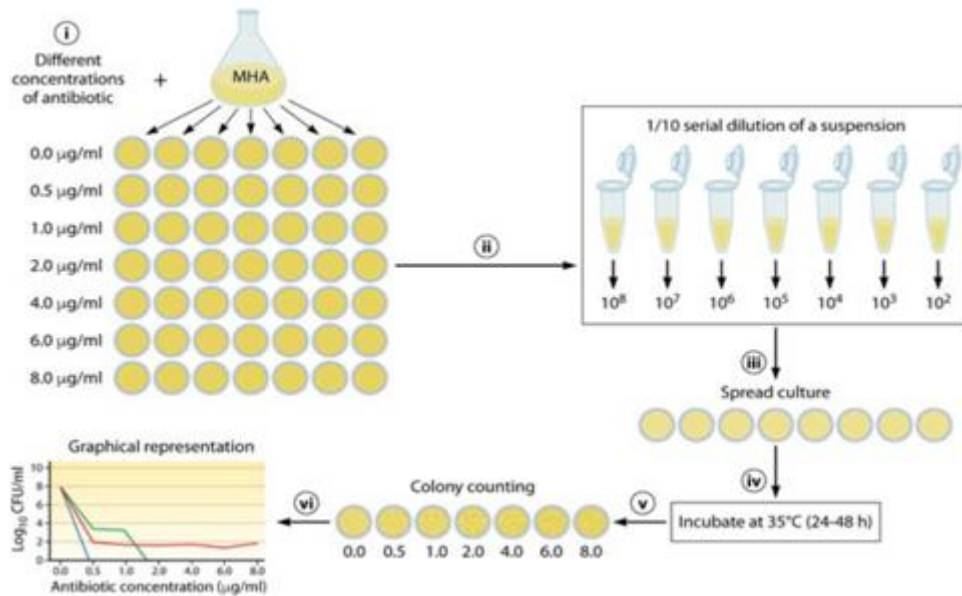


Figura 3. Análisis de perfil poblacional para medir heteroresistencia. El análisis de perfil poblacional, también conocido como método PAP, sirve para detectar el fenómeno de resistencias en bacterias. Para conocer la susceptibilidad de un determinado antibiótico, se inocula una población bacteriana y se siembra en diferentes placas con medio de agar Müeller-Hinton. Cada una de las placas contendrá una determinada concentración de antibiótico. Estas placas se inoculan en las condiciones adecuadas, y una vez pasado el tiempo requerido, se hace un recuento de colonias. Por último, se representa gráficamente la concentración de antibiótico frente al recuento de las unidades formadoras de colonias (Ezadi et al., 2019).

Las **placas de agar** son otro método para determinar heteroresistencia, y consiste en la utilización de placas con un gradiente lineal de concentración de antibiótico (Figura 4). Cuando las bacterias alcancen la concentración mínima inhibitoria, cesarán su crecimiento. Si se observa una parte de la población que continúa su crecimiento cuando el resto se ha detenido, se confirma que existe heteroresistencia, ya que mientras mayor sea la concentración a la que paralizan su crecimiento, es decir, mayor concentración mínima inhibitoria (CMI), mayor será la resistencia que las bacterias presentan (Liu et al., 2011).

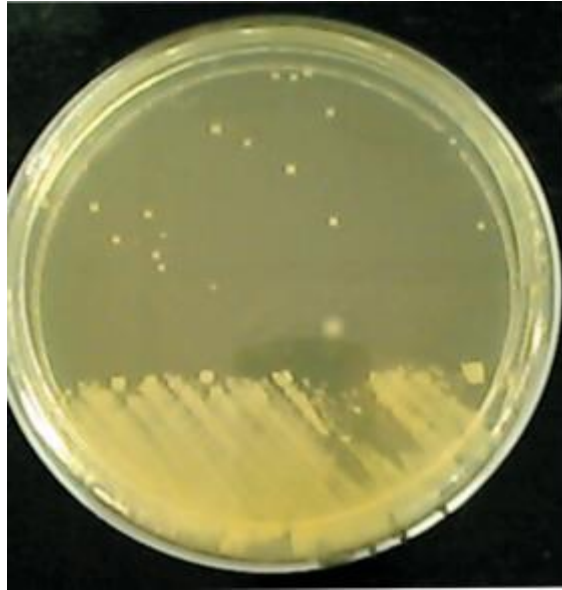


Figura 4. Placas de agar para medir heteroresistencia.

En una placa de Petri, se siembra una población bacteriana en un medio de agar y se añade un determinado antibiótico cuya sensibilidad se quiere estudiar. El antibiótico se va añadiendo en concentración creciente, de manera que en un extremo de la placa la concentración será la mínima, y en el otro extremo la máxima. A concentraciones bajas de antibiótico, se observa crecimiento bacteriano, pero llegaremos a un punto donde éste cederá, y esa concentración es la que corresponde con la concentración mínima inhibitoria (CMI). En este ejemplo, podemos observar colonias aisladas una vez que el crecimiento de la mayoría se ha detenido, esto indica que existen subpoblaciones bacterianas con un nivel de resistencia a este antibiótico superior al resto de la población, es decir, existe heteroresistencia (Herrera et al., 2011).

La **prueba de difusión en disco o Épsilon-test (É-test)** son dos métodos sencillos y similares que también permiten estudiar los distintos niveles de resistencia de una población bacteriana. En ambos casos, la población crecerá en una placa, en la cual se depositarán discos, que contienen una concentración determinada de un antibiótico en concreto (Figura 5), o tiras impregnadas de concentraciones crecientes de un antibiótico (Figura 6). Tanto los discos como las tiras producirán un halo de inhibición en la placa, cuando se alcance la concentración mínima eficaz para detener el crecimiento de la bacteria en estudio. Si dentro de esos halos de inhibición se observa el crecimiento de colonias, se confirma que existen bacterias con un nivel de resistencia mayor que el resto (El-Halfawy & Valvano, 2015).

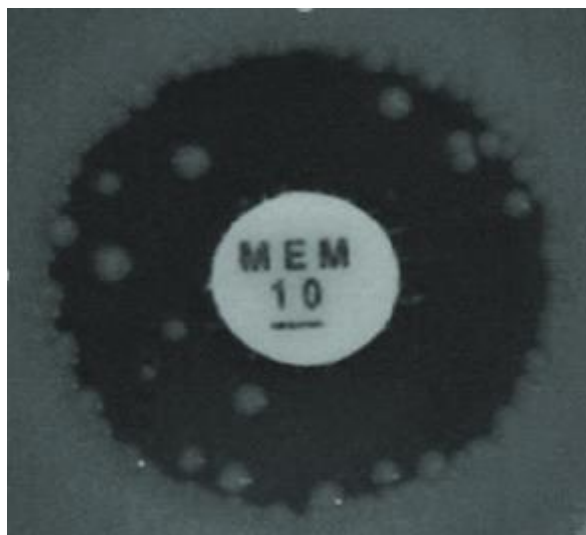


Figura 5. Prueba de difusión de discos para medir heteroresistencia. La prueba de difusión de discos es otro método utilizado para medir heteroresistencia. Es un método sencillo que consiste en colocar sobre una placa en la que hemos sembrado una determinada bacteria, discos impregnados con una concentración determinada de antibiótico. En la imagen superior, podemos observar un halo de inhibición que indica que la bacteria es sensible al antibiótico y ha detenido su crecimiento, sin embargo, dentro del halo se pueden apreciar colonias, que desvelan que hay subpoblaciones resistentes al antibiótico y, por tanto, no han cedido su crecimiento. El borde del halo indica la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Morosini et al., 2012b).

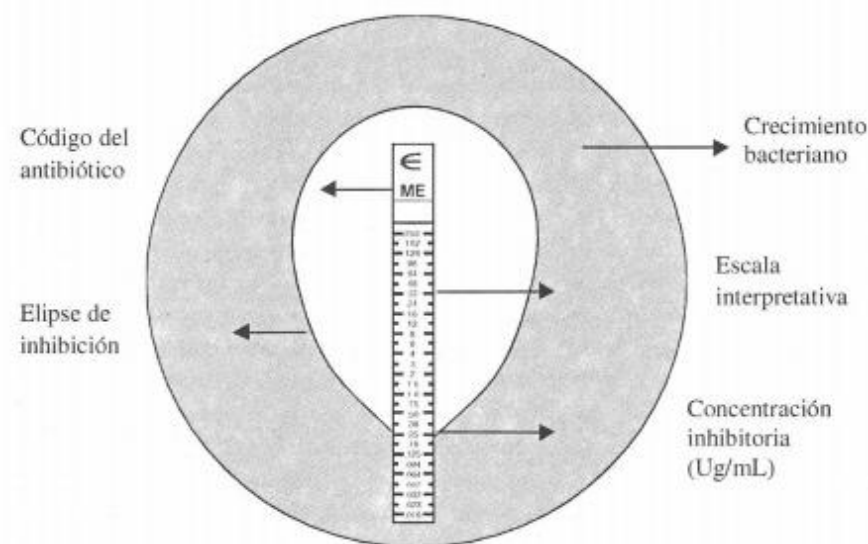


Figura 6. El Épsilon test es un método para determinar heteroresistencia. El Épsilon-test o Etest es un método muy similar a la prueba de difusión en discos, pero en este caso, se usa una tira impregnada con diferentes concentraciones de antibiótico. A medida que aumenta la concentración de éste, el halo de inhibición aumenta también. El punto en el que el halo de inhibición y la tira coinciden, es la concentración mínima inhibitoria. Si dentro del halo de inhibición se observan colonias aisladas, se confirma que existe heteroresistencia (Jaramillo Velásquez, 1988).

Se han desarrollado unas tiras especiales para estudiar la resistencia a determinados antibióticos, como por ejemplo para los glucopéptidos, para lo cual se usan tiras de doble cara que contienen por un lado Vancomicina y, por el otro lado, Teicoplanina (El-Halfawy & Valvano, 2015).

Ambos métodos son métodos sencillos usados diariamente en el laboratorio; sin embargo, no proporcionan buenos resultados en poblaciones que presenten baja frecuencia de heteroresistencia debido a la baja densidad de células en la placa. Son método con una pobre sensibilidad y especificidad, pero más rápido, fácil y asequible que el PAP (Andersson et al., 2019).

La **citometría de flujo** también puede utilizarse para detectar heteroresistencia. La citometría de flujo es un método que permite un análisis rápido de células individuales y, al mismo tiempo, permite la evaluación cuantitativa de la distribución de algunas propiedades fenotípicas, bioquímicas y/o moleculares de la población. Esta técnica se basa en conducir células a través de un canal donde pasan de forma alineada individualmente. En este canal hay una zona de interrogación donde las células interaccionan con una fuente luminosa, y se produce la dispersión de la luz y emisión de fluorescencia. Esta información se procesa a señales digitales que posteriormente se analizan (Figura 7). Los datos que se obtienen son de elevada fiabilidad y permiten identificar poblaciones que aparecen con una frecuencia muy baja dentro de la población global. Es el método empleado para estudiar la heteroresistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina (MRSA) (Jarzembowski et al., 2009).

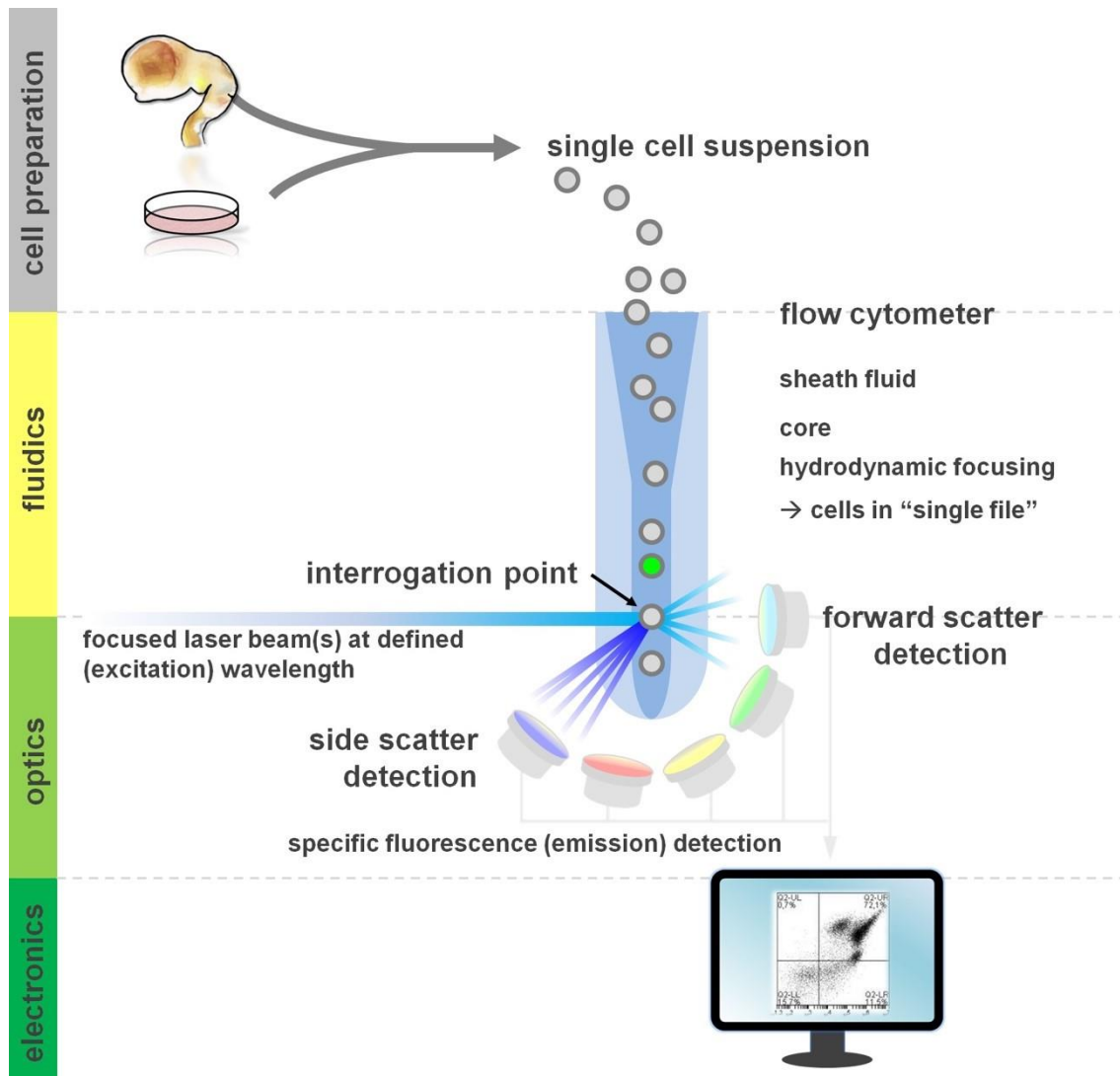


Figura 7. Análisis por citometría de flujo y componentes de un citómetro de un citómetro de flujo.

La muestra contiene células en suspensión que, mediante un canal de flujo, llega a una posición donde el láser incide sobre ellas y se produce la emisión de fluorescencia, detectada por los detectores y convertida en señales electrónicas. Dichas señales son procesadas y visualizadas en un ordenador (Menon et al., 2014).

La **prueba de microdilución en caldo** es un método utilizado frecuentemente en el laboratorio. Se realiza en una placa de poli-estireno que contiene pocillos con diluciones de diferentes antibióticos. Es posible medir al mismo tiempo unas siete u ocho diluciones y de diez o doce antibióticos diferentes. El medio Mueller-Hinton es el recomendado para pruebas de susceptibilidad porque al ser un medio de cultivo no selectivo y no diferencial, permitirá el crecimiento de todo tipo de microorganismos que se cultiven ahí. Uno de los pocillos debe utilizarse como control, es decir, únicamente contiene medio. Esto se realiza para poder comparar el crecimiento con el resto de pocillos que si contienen antibiótico

(Figura 8) (Domingoribas, 2006). En este método, la lectura de la CMI de la población resistente va a depender del tamaño del inóculo y de la tasa de crecimiento de las bacterias resistentes (Andersson et al., 2019).

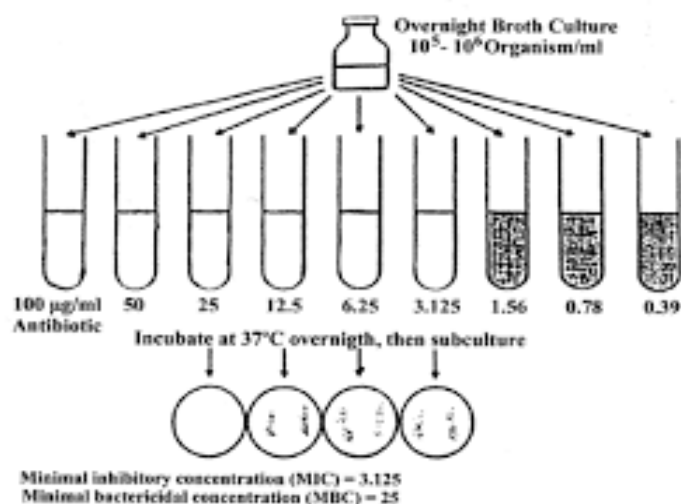


Figura 8. Prueba de microdilución en caldo.

A partir de un caldo de cultivo, con una determinada concentración de microorganismos, se van añadiendo diferentes concentraciones de un determinado antibiótico en distintos tubos de ensayo. A continuación, se hace la siembra en placas, se incuban a las condiciones adecuadas, y una vez pasado el tiempo requerido, se observa el crecimiento de bacterias en ella. La placa con la concentración más baja de antibiótico en la cual no se observe crecimiento, indicará la CMI (Domingoribas, 2006).

Además de todos estos métodos comentados, existen muchos más, pero se han resumido únicamente los más utilizados en el laboratorio. Cada uno de ellos tiene sus ventajas e inconvenientes y, dependiendo de la situación y el objetivo que estemos buscando, se usará uno u otro (Tabla 1).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los diferentes métodos utilizados para medir la aparición de heteroresistencia a antibióticos (tabla modificada de (Andersson et al., 2019).

Método	Ventajas	Desventajas
Perfil de Análisis poblacional (PAP)	Proporciona buena información sobre la frecuencia con la que aparece la heteroresistencia y sobre la CMI de la subpoblación.	Método costoso y laborioso, por lo que solo se usa para confirmar casos clínicos específicos.

Placas de agar	Método usado rutinariamente en el laboratorio. Cuando detecta la heteroresistencia, da información sobre la frecuencia con la que ésta aparece y sobre la CMI.	Se usa un inóculo de muestra pequeño, por lo que no detecta las subpoblaciones heteroresistentes que aparecen con baja frecuencia.
Épsilon test y prueba de difusión en disco	Métodos sencillos y asequibles, por lo que se usan frecuentemente en el laboratorio.	Deficiente detección de las subpoblaciones resistentes que aparecen con baja frecuencia debido a la baja densidad de células.
Citometría de flujo	Permite un análisis de células individuales. Es un método rápido. Proporciona información sobre miles de células. Posibilidad de evaluar cuantitativamente la distribución de algunas propiedades de la población.	Es un método más laborioso y además, requiere personal más cualificado.
Microdilución en caldo	Es un método rápido y económico.	Necesita una mayor densidad de células por lo que aumenta el riesgo de los efectos por el inóculo.

EJEMPLOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

Tanto las bacterias Gram negativas como las Gram positivas son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia para resistir la acción de diferentes grupos de antibióticos.

Mecanismos de resistencia desarrollados por microorganismos Gram negativos

Resistencia a los beta-lactámicos

Uno de los mecanismos de resistencia más comunes en la actualidad, es la producción de betalactamasas, que inhiben la actividad de los antibióticos beta-lactámicos (aquellos que presenten el anillo beta-lactámico). Actualmente se utiliza una estrategia terapéutica que consiste en combinar estos fármacos con inhibidores de las beta-lactamasas, por ejemplo, el tratamiento de amoxicilina con ácido clavulánico.

Sin embargo, también se han desarrollado mecanismos de resistencia hacia estas combinaciones. De manera que han aparecido betalactamasas resistentes a la acción de los inhibidores (IRT) (Navarro et al., 2011).

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas capaces de hidrolizar y causar resistencia a antibióticos como penicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y monobactámicos, pero no a cefamicinas ni carbapenémicos. Otra característica de este tipo de enzimas es la sensibilidad a la acción del ácido clavulánico (Navarro et al., 2011).

Existen diversos procedimientos de detección fenotípica de betalactamasas, la mayoría de ellos basados en la actividad inhibidora del ácido clavulánico (Bradford, 2001). Uno de ellos es la prueba de difusión de discos. La presencia de bacterias resistentes no solo se sospecha por la disminución de los halos de inhibición, sino que la colocación de los discos de manera estratégica produce efecto sinérgico entre las cefalosporinas de amplio espectro o los monobactámicos y el ácido clavulánico (Bradford, 2001; Bush & Jacoby, 2010; Pino I. et al., 2007). Otra prueba de detección para este tipo de resistencia es la microdilución que permite conocer la CMI de las cefalosporinas en ausencia y en presencia de ácido clavulánico. También se puede realizar el Épsilon-test, usando una combinación de tiras impregnadas de cefalosporinas y otras impregnadas con la combinación del antibiótico y el inhibidor de betalactamasas. Todas estas técnicas comentadas, requieren como mínimo 48 horas desde que el patógeno llega al laboratorio. Para disminuir este tiempo, se han desarrollado medios cromogénicos para el aislamiento selectivo y la identificación presuntiva de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido, como ChromID ESBL; Brilliance ESBL agar y el CHROMagar ESBL (Navarro et al., 2011).

Resistencia a los carbapenémicos.

En los últimos años se ha producido una gran alarma por la existencia de bacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos (subgrupo dentro de los antibióticos betalactámicos). Éstos se caracterizan por su amplio espectro y su eficacia contra bacterias resistentes a muchos antibióticos (Oliver, 2009; Queenan & Bush, 2007; Walsh, 2010).

Algunas bacterias son capaces de producir unas enzimas denominadas carbapenemasas. Entre las carbapenemasas existen varios grupos: algunas de ellas son inhibidas por

compuestos como el ácido clavulánico, sulbactam ó tazobactam y otras son resistentes a la acción de los inhibidores. Sin embargo; algunas también pueden ser inhibidas por compuestos quelantes como el EDTA (Nicolau & Oliver, 2010).

La detección fenotípica de las carbapenemasas depende de diferentes factores como el perfil hidrolítico, la probabilidad de inhibición por los compuestos citados, la epidemiología local, la identidad del microorganismo en estudio. Además es imprescindible valorar la posibilidad de que existan otros mecanismos de resistencia que enmascaren el fenotipo que les confiere las carbapenemasas, como puede ser la alteración de la permeabilidad, la presencia de bombas de expulsión o la presencia simultánea de otras betalactamasas (Nicolau & Oliver, 2010; Walsh, 2010).

Ante la sospecha de existencia de resistencia a los antibióticos carbapenémicos, generalmente ilustrada por el aumento de los valores de la concentración mínima eficaz, es importante verificar que existe un mecanismo de inactivación de estos fármacos. El método de detección utilizado como referencia es el ensayo espectrofotométrico. Dado que este método no está al alcance de todos los laboratorios, se han propuesto métodos biológicos sencillos que permiten la detección de carbapenemasas (Aznar et al., 2007). Entre estos métodos sencillos destaca la prueba modificada de Hodge. Esta prueba consiste en un test basado en la inactivación del carbapenémico por la carbapenemasa producida por una bacteria, lo que me permite que una cepa indicadora y sensible a las carbapenemasas, extienda su crecimiento cerca del disco del carbapenémico y a lo largo de la estría de la cepa productora de la carbapenemasa (Cercenado, 2015) (Figura 9). Tiene una elevada sensibilidad pero no diferencia entre los distintos grupos de carbapenemasas. Así mismo se han observado falsos negativos debido a la baja expresión de la enzima, que puede evitarse añadiendo sulfato de zinc al medio, que incrementa la expresión de algunos tipos de estas enzimas (Aznar et al., 2007; Tlanusta Garret et al., 2001).

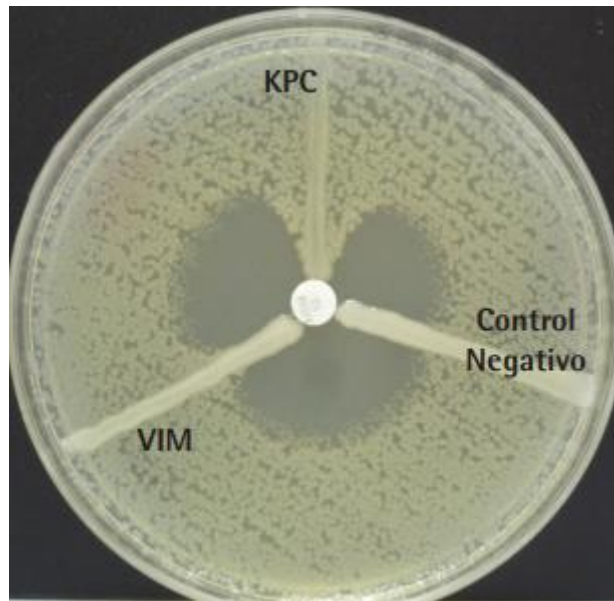


Figura 9. Prueba de Hodge modificada.

En la figura superior podemos observar la siembra de una bacteria sensible a carbapenemasas en una placa con un disco impregnado de un carbapenémico. Las estrías corresponden a cepas productoras de carbapenemasas de tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa, donde se detectaron por primera vez), otra de tipo VIM (Veronese IMipememase, se detectaron por primera vez en Verona en *Pseudomonas aeruginosa*), y otra estría control con una cepa no productora de estas enzimas. Se puede observar, el aumento de crecimiento de la bacteria sensible en las dos estrías donde hay producción de enzimas (Cercenado, 2015).

Para detectar microorganismos productores de carbapenemasas directamente de muestras clínicas, se ha propuesto la utilización de medios cromogénicos, tanto los utilizados para la detección de betalactamasas de amplio espectro, como otros específicos para estas enzimas como el CHROMagar (Navarro et al., 2011).

Una vez confirmado que la cepa problema produce enzimas que inactiva a los antibióticos carbapenémicos, es preciso diferenciar el tipo de carbapenemasa. Se han diseñado pruebas de aproximación de discos, colocando a una distancia estratégica el disco de antibiótico y el de inhibidor, y pruebas E-test con tiras impregnadas con el carbapenémico y el inhibidor. Con estas técnicas se determina el tipo de enzima, observando el comportamiento ante la presencia de diferentes compuestos que pueden o no, reducir su resistencia, actuando como inhibidores (Aznar et al., 2007; Nordmann et al., 2011).

Como opción terapéutica y alternativa para combatir a los microorganismos productores de carbapenemasas se ha propuesto la utilización de tigecilina y colistina, realizando antes un antibiograma para comprobar su sensibilidad. En caso de infecciones urinarias, se sugiere el uso de fosfomicina o nitrofurantoina (Navarro et al., 2011).

Resistencia a quinolonas

El mecanismo de resistencia hacia las quinolonas más común consiste en mutaciones en los genes de las topoisomerasas, sobre todo en los genes *gyrA* y *parC*. Otros mecanismos de resistencia conocidos a estos antibióticos son la sobreexpresión de bombas de expulsión activa o la alteración en el número de las porinas. Sin embargo, estos últimos mecanismos causan un nivel de resistencia menor (Martínez, 2019; Ruiz, 2003).

Resistencia a aminoglucósidos

El principal mecanismo de resistencia a este grupo de antibióticos se debe a la inactivación enzimática. Se han descrito tres tipos de enzimas: las acetiltransferasas (AAC), cuyo mecanismo es la acetilación de un grupo amino del antibiótico, las fosfotransferasas (APH), que fosforilan a un grupo hidroxilo, y las nucleotidiltransferasas (ANT), que adenilan a grupos hidroxilos (Navarro et al., 2010; Schmitz et al., 1999; Vakulenko & Mobashery, 2003).

También se han descrito genes responsables de la metilación postranscripcional del ARN ribosómico, que provoca una resistencia a todos los aminoglucósidos, excepto la neomicina (Navarro et al., 2010). Además, existen mutaciones en porinas o estructuras del polisacárido, que afectan a la difusión pasiva de estos antibióticos a través de la membrana externa y disminuyen la sensibilidad del microorganismo hacia estos fármacos (Navarro et al., 2011).

Para la detección de los distintos fenotipos de resistencia adquiridos, se realiza un antibiograma donde se incluyen los distintos aminoglucósidos y se analiza el patrón de resistencia que puede sugerir la presencia de una enzima desactivante (Navarro et al., 2010).

Mecanismos de resistencia desarrollados por microorganismos Gram positivos

A continuación se explicarán los mecanismos de resistencia más frecuentes desarrollados por microorganismos Gram positivos, en concreto en el género *Staphylococcus*, frente a las familias de antibióticos más habituales (Morosini et al., 2012b).

Resistencia a los beta-lactámicos

La producción de betalactamasas por parte de estafilococos implica resistencia a todas las penicilinas, excepto a las isoxazolilpenicilinas, así como sensibilidad a la combinación de betalactámico e inhibidor de betalactamasas, a las cefalosporinas y a los carbapenémicos.

Para la detección de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina por producción de betalactamasas, el método más adecuado es la prueba de difusión en disco. Para determinar la CMI a las penicilinas, se realiza la prueba de microdilución en caldo, utilizando el medio de Müller-Hinton. Cuando el halo de inhibición en la prueba de discos sea igual o superior a 29 milímetros o la CMI sea menor a 0,12, se confirma que el microorganismo es realmente sensible a las penicilinas mediante una prueba con la cefalosporina cromogénica nitrocefín. Para ello se utilizan, colonias crecidas en el borde del halo de inhibición de la penicilina, ya que ahí es donde la producción de las enzimas ha sido inducida por la incubación previa en presencia de antibiótico. La prueba consiste en depositar con el asa las colonias de esta zona sobre un disco impregnado con el nitrocefín. Al hidrolizarse en presencia de la betalactamasa experimenta un cambio en su estructura dando un producto naranja-rojizo (Morosini et al., 2012a).

Resistencia a los macrólidos y a la clindamicina

Los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas B son tres familias de antimicrobianos que poseen mecanismos de acción similares, actuando todos en la subunidad 50S del ribosoma. Los macrólidos inhiben la translocación del aminoacil ARNt, inhibiendo así la síntesis proteica. Las lincosamidas se unen a la porción 23 S de la subunidad 50S e inhibe la reacción de la transpeptidasa, inhibiendo así la replicación de la cadena peptídica. Las estreptogramineas, actúan de modo diferente según si son clase A o clase B. Las de clase A se unen al sitio P del ribosoma e impiden algunos pasos de la elongación durante la traducción del ARN mensajero, provocando un cambio conformacional en la subunidad 50 S que da lugar a un aumento de la actividad de las estreptogramineas B, las cuales se encargan de impedir la extensión de las cadenas proteicas y la liberación de péptidos incompletos.

En los estafilococos se pueden observar los siguientes fenotipos de resistencia:

- 1) Fenotipo cMLS_B: resistencia constitutiva a la eritromicina, y demás macrólidos de catorce y quince átomos de carbono, a la clindamicina y a las estreptogramineas B por modificaciones en la diana ARN_r 23S debidas a la acción de metilasas.
- 2) Fenotipo iMLS_B: resistencia inducible a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina y a las estreptograminas B.
- 3) Fenotipo MS_B: resistencia a la eritromicina y otros macrólidos de catorce y quince átomos, a las estreptograminas B pero con sensibilidad a clindamicina

Los diferentes fenotipos se pueden identificar en el laboratorio mediante pruebas de difusión con discos de eritromicina y de clindamicina, empleando el D-test y por dilución en caldo, empleando una combinación de ambos antimicrobianos. Para la realización del D-test, se coloca un disco de eritromicina de 14 μg y otro de clindamicina de 2 μg , separados a una distancia de 15 o 20 mm sobre la superficie de la placa inoculada. Se pueden obtener los siguientes resultados:

- 1) Resistencia absoluta a la eritromicina y a la clindamicina, sin achatamiento del halo de inhibición de esta última. (D-test negativo, cMLS_B)
- 2) Resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina pero con un achatamiento del halo del disco de la clindamicina en la proximidad del disco de la eritromicina (D-test positivo, iMLS_B) (Figura 10).



Figura 10. D-test con resultado positivo.

Se observa resistencia a la eritromicina, porque no se detiene el crecimiento en la proximidad del disco y sensibilidad a la clindamicina, ya que se observa un halo de inhibición. Además, el halo de inhibición presenta achatamiento en el lado próximo al disco de eritromicina (Montoya Claramunt et al., 2009).

- 3) Resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina sin achatamiento del disco (D-test negativo, MS_B) (Figura 11) (Leclercq, 2002).



Figura 11. D-test con resultado negativo.

En este ejemplo se observa que la bacteria es sensible a la clindamicina y resistente a la eritromicina y no se observa achatamiento del disco. Corresponde con el fenotipo MS_B (Montoya Claramunt et al., 2009).

PROBLEMÁTICA ACTUAL Y ESTRATEGIAS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La resistencia a los antimicrobianos es una de las mayores amenazas para la salud pública a nivel mundial, por lo que hay que tomar medidas para evitar alcanzar la llamada “era post-antibiótica” (Angles, 2018), aquella en la que los antibióticos no serán efectivos.

El 90% del consumo de antibióticos se consume en atención primaria (Palop Larrea et al., 2003) donde una tercera parte de las consultas pertenecen a enfermedades infecciosas. Dentro de estas consultas, aproximadamente el 50% de los tratamientos son inadecuados (Dellit, 2007).

Aunque la aparición de resistencias es un fenómeno natural, el uso indiscriminado de estos fármacos está acelerando dicho proceso. Por este motivo, es necesario concienciar a la población sobre el Uso Racional de Antibióticos (URA). Una forma de realizar URA es implantar programas de optimización de antimicrobianos (PROA) basados tanto en políticas restrictivas como en políticas no restrictivas, ya que se ha demostrado que el uso racional de antibióticos favorece la prevención de la resistencia antimicrobiana (MacDougall & Polk, 2005).

A finales del siglo XX, los principales problemas de salud en nuestro país estaban causados por bacterias Gram positivas, sobre todo por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina a nivel hospitalario (MRSA) y *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilinas y macrólidos a nivel comunitario. Sin embargo, en la última década otras

bacterias Gram positivas han comenzado a tomar relevancia por la aparición de resistencias. Sin embargo, la mayor amenaza actual es la resistencia por parte de bacterias Gram negativas. Estas bacterias son capaces de acumular resistencias hacia todos los antibióticos, lo que se conoce como pan-resistencia, PDR, o hacia casi todos los antibióticos, a lo que se llama resistencia extensa o XDR. También existen las cepas MDR, que son aquellas resistentes a múltiples fármacos. Más concretamente, las cepas MDR son aquellas que son resistentes a al menos un antibiótico en tres o más categorías de antibióticos, las cepas XDR aquellas resistentes a al menos un agente de todas las categorías excepto en una o dos y las cepas PDR aquellas resistentes a todos los agentes de todas las categorías de antibióticos (Magiorakos et al., 2012). Principalmente las enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* son las que mayor amenaza causan actualmente por su resistencia a la gran mayoría de antibióticos (Zubkov et al., 2011).

El problema cada vez está siendo más preocupante, en 2008 más del 30% de las cepas causantes de infecciones bacterianas en los hospitales españoles eran MDR, y hasta el 10% presentaban perfiles de XDR (Magiorakos et al., 2012).

Las enterobacterias son uno de los principales microorganismos causantes de infecciones tanto a nivel comunitario como hospitalario. El principal problema es la capacidad que están desarrollando de producir beta-lactamasas de espectro extendido (Zubkov et al., 2011). Así mismo, otra gran amenaza es la aparición de enterobacterias capaces de producir carbapenemasas, ya que el grupo de los carbapenémicos suponen el último escalón disponible para el tratamiento de muchas infecciones (Oteo et al., 2013).

La rapidez de la propagación de las resistencias, la dificultad para tratar infecciones causadas por microorganismos resistentes, la duración de éstas y el aumento de morbilidad, mortalidad y costes que ello supone, el retraso que estas infecciones causan en los avances de la medicina como son los trasplantes de órganos y la quimioterapia, son algunas de los problemas que necesitan urgentemente que se emprendan acciones para combatir esta amenaza.

Las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud y la Comisión Europea indican que es necesario un plan global y multidisciplinario, que incluya a todos los profesionales de la salud, a entidades sociales que favorezcan la difusión de los mensajes a la opinión pública y, a responsables de la administración con capacidad para

implementar estrategias de control (Zubkov et al., 2011). Dado que la existencia y diseminación de las resistencias a antibióticos es un problema complejo y multifactorial que afecta a todos estos sectores es imprescindible la implantación de medidas globales y bien coordinadas.

Por tanto, los responsables de combatir esta amenaza son:

- La sociedad en conjunto, en especial los pacientes, que deben comprender que los antibióticos son fármacos eficaces contra infecciones bacterianas, y que su uso en otras circunstancias, disminuirán su efecto cuando realmente sean necesarios.
- Los cuidadores de animales, veterinarios, ganaderos, que deben comprender el peligro que supone la ausencia de antibióticos para la salud de los animales y el aumento de la probabilidad de que se produzcan zoonosis.
- Los profesionales de la salud encargados de prescribir, autorizar y administrar los medicamentos tanto en atención primaria como a nivel hospitalario, que deben utilizar los recursos de manera óptima y divulgar la importancia de ello.
- Los organismos con capacidad para proporcionar herramientas de ayuda a la prescripción.
- Docentes de la rama sanitaria.
- Investigadores e industria farmacéutica que deben esforzarse en el desarrollo de nuevos antibióticos u otras estrategias que los sustituyan.
- Los medios de comunicación para concienciar a la población sobre el problema que supone el fin de los antibióticos, y las medidas a tomar para evitarlo.

En 2011, la Comisión Europea hizo pública una comunicación donde se establecía un Plan de Acción sobre Resistencia a Antibióticos (Zubkov et al., 2011). Este plan incluye diversas estrategias que se resumen a continuación (Tabla 2):

Tabla 2. Líneas estrategias para la lucha contra la resistencia a antibióticos recogidas en el plan de acción expuesto en la comunicación de la Comisión Europea en Noviembre de 2011 (Zubkov et al., 2011).

LÍNEA ESTRATÉGICA	OBJETIVOS
Primera línea estratégica	Vigilancia del consumo de antibióticos y de la resistencia a éstos
Segunda línea estratégica	Control de las resistencias bacterianas
Tercera línea estratégica	Identificar e impulsar medidas alternativas y/o complementarias de prevención y de tratamiento
Cuarta línea estratégica	Formación a los profesionales sanitarios
Quinta línea estratégica	Definición de prioridades en materias de investigación
Sexta línea estratégica	Comunicación y sensibilización a la población

La primera línea estratégica se basaba en la vigilancia del consumo de antibióticos y de la resistencia a éstos. La finalidad es afianzar la función de las redes de vigilancia ampliando los objetivos y alcances para mejorar el conocimiento sobre el uso de antibióticos y el desarrollo de las resistencias. Para conseguirlo se debían tomar una serie de medidas encaminadas a: la monitorización del consumo de antibióticos para mejorar los datos sobre su consumo y así reforzar la vigilancia de las ventas de éstos. También se pretende controlar el uso de antibióticos “críticos”, que son aquellos indispensables para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multiresistentes y requieren una vigilancia específica, limitando su prescripción para preservar su eficacia.

La segunda línea estratégica consistía en el control de las resistencias bacterias, controlando la difusión de las bacterias resistentes, sobre todo de aquellas con mecanismos de resistencia transferibles.

Otra de las líneas iba encaminada a identificar e impulsar medidas alternativas y/o complementarias de prevención y tratamiento. El objetivo era desarrollar pruebas de sensibilidad (antibiograma) y métodos de diagnóstico rápidos, para conocer la susceptibilidad o resistencias del microorganismo causante de la infección a los diferentes tratamientos. De esta manera es posible prescribir el más adecuado según sus características, es decir, priorizar el tratamiento dirigido. Además, se promulgaba la

mejora de las medidas de higiene y el desarrollo de normas para disminuir el riesgo de infección y transmisión, sobre todo, en el ámbito hospitalario.

La formación de los profesionales sanitarios era otra de las estrategias que recogía este plan. Así se pretendía conseguir su adhesión a las estrategias de salud pública. Se proponía la formación continuada a materias relacionadas con la resistencia a antimicrobianos, así como la autoevaluación de los profesionales.

También se hacía hincapié en la importancia de definir prioridades en materias de investigación, presionando a la industria farmacéutica para la búsqueda de nuevos fármacos alternativos a los ya existentes.

En último lugar, la sexta línea estratégica que recogía este plan se basaba en la comunicación y sensibilización de la población en su conjunto.

Además del uso racional, como una estrategia crucial, es necesario pensar en nuevas opciones de tratamiento.

El desarrollo de nuevos antibióticos es una línea de investigación muy estancada, desde la década de 1980 se viene percibiendo una disminución del número de nuevas moléculas (Baquero & Barberán, 2006). ¿A qué se debe esto? En primer lugar, la investigación en este campo procede casi en su totalidad a la empresa privada, sin embargo, la rentabilidad económica es mucho menor por diferentes razones: requerimientos legales y de registro cada vez más exigentes, corta duración de los procesos infecciones, vida media de los antibióticos corta, comercialización de alto riesgo y precio generalmente bajo (Superior et al., 2003). Estas razones son algunas por las que la industria farmacéutica muestra un gran desinterés en la investigación de antibiótico novedosos (De & Control, 2017).

Aunque se trabaja sobre otras alternativas diferentes al uso de nuevos antibióticos, nos encontramos sin duda ante la principal amenaza de este siglo. Si no se toman soluciones drásticas, llegaremos a los que se conoce como la “era post-antibiótica” que supondrá un retroceso no solo en el tratamiento de infecciones bacterianas directamente, sino también en la mayoría de las operaciones y actividades hospitalarias. Esto supondrá una mayor mortalidad y morbilidad causada por enfermedades infecciosas.

Por este motivo, es de crucial importancia, entender los mecanismos responsables de la resistencia a antibióticos y profundizar en la habilidad de las bacterias para sobrevivir en presencia de los antibióticos sin mutaciones. La heterogeneidad fenotípica ha sido

recientemente añadida a la lista de factores que limitan la eficacia del tratamiento con antibióticos (Sánchez-Romero & Casadesús, 2014).

Además del avance en el desarrollo de nuevos fármacos y nuevas estrategias terapéuticas, hay que cuidar y evitar la ineficacia de los ya existente con el uso adecuado y racional de los antibióticos: un papel de todos y cada uno de los individuos de la sociedad.

CONCLUSIÓN

Los antibióticos forman parte de los fármacos más comúnmente prescritos en el mundo. Éstos pueden salvar millones de vidas, sin embargo, su uso indiscriminado está conduciendo hacia una situación catastrófica: encarecimiento de los servicios de salud, incremento de los efectos adversos, aparición de resistencias y, en último lugar, ineficacia en la prevención y tratamiento de infecciones que hasta la fecha se podían combatir. No se puede concebir un mundo sin antimicrobianos efectivos. Por lo tanto, es el momento para actuar y evitar que el problema empeore o se vuelva inmanejable. Actualmente, el uso racional de los antibióticos es el elemento crítico para disminuir la presión selectiva y favorecer la prevención de la resistencia a antibióticos (MacDougall & Polk, 2005).

Así mismo, es interesante destacar la importancia del desarrollo de nuevas estrategias y, tal y como se ha destacado en este trabajo, el papel que ejerce la heterogeneidad fenotípica en limitar la eficacia de los antibióticos puede ser una importante línea de actuación. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias en esta dirección puede suponer nuevas formas de combatir la aparición de resistencias a antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersson DI, Hughes D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:901–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00289.x>.
- Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:479–96. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0218-1>.
- Angles E. Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana ¿hacia dónde vamos? *Rev Medica Hered* 2018;29:3. <https://doi.org/10.20453/rmh.v29i1.3253>.
- Aznar J, Blanco MA, Lepe JA, Otero L, Vázquez F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. vol. 25. 2007.
- Baquero J, Barberán J. ¿Tendremos nuevos antibióticos? *Rev Esp Quimioter* 2006;19:113–6.

- Barbosa TM, Levy SB. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* 2000;182:3467–74.
<https://doi.org/10.1128/JB.182.12.3467-3474.2000>.
- Becerra G, Plascencia A, Luévanos A, Domínguez M, Hernández I. Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecc y Microbiol* 2009;29:70–6.
- Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933–51. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:969–76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.
- Caldas Arias L. Bacterias-Biofilms y resistencia antimicrobiana. *Rev Fac Ciencias La Salud, Univ Del Cauca* 2015;17:20–7.
- Caws M, Duy PM, Tho DQ, Lan NTN, Hoa DV, Farrar J. Mutations prevalent among rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam. *J Clin Microbiol* 2006;44:2333–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00330-06>.
- Cercenado E. Laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Bacteriología. Rev Esp Quim* 2015;28:8–11.
- Corona F, Martínez JL. Phenotypic resistance to antibiotics. *Antibiotics* 2013;2:237–55.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics2020237>.
- De D, Control D. ERA POST-ANTIBIÓTICA 2017:1–4.
- Dellit TH. Summary of the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Infect Dis Clin Pract* 2007;15:263–4.
<https://doi.org/10.1097/IPC.0b013e318068b1c0>.
- Domingoribas C. Prueba de la diferencia de potencial nasal para el diagn. *Arch Bronconeumol* 2006;42:33–8.
- Dupont M, Dé E, Chollet R, Chevalier J, Pagès JM. Enterobacter aerogenes OmpX, a cation-selective channel mar- and osmo-regulated. *FEBS Lett* 2004;569:27–30.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.047>.
- El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:191–207. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-14>.
- Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins. *J Clin Microbiol* 2019;57:1–20.
- Fernández L, Hancock REW. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2012a;25:661–81.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>.
- Fernández L, Hancock REW. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux

pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2012b;25:661–81.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>.

Herrera ME, Mobilia LN, Posse GR. Sensibilidad de acinetobacter a la colistina evaluada mediante los métodos de predifusión y de concentración inhibitoria mínima. detección de aislamientos heterorresistentes. *Rev Argent Microbiol* 2011;43:115–9.

Jaramillo Velásquez S. Epsilon Etest. *CES Med* 1988;12:35–41.

Jarzembowski T, Wiśniewska K, Józwick A, Witkowski J. Heterogeneity of methicillin-resistant staphylococcus aureus strains (MRSA) characterized by flow cytometry. *Curr Microbiol* 2009;59:78–80. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9395-x>.

Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, Fitzmaurice AM, Sirakova TD. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* 1997;24:263–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3361705.x>.

Lapage G. Mode of action of penicillin. *Nature* 1945;156:272–3.
<https://doi.org/10.1038/156272a0>.

Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002;34:482–92.
<https://doi.org/10.1086/324626>.

Linares JF, Moreno R, Fajardo A, Martínez-Solano L, Escalante R, Rojo F, et al. The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 2010;12:3196–212. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02292.x>.

Liu YQ, Li JR, Du JF, Hu M, Bai H, Qi J, et al. Accurate assessment of antibiotic susceptibility and screening resistant strains of a bacterial population by linear gradient plate. *Sci China Life Sci* 2011;54:953–60. <https://doi.org/10.1007/s11427-011-4230-6>.

Luster MI, Boorman GA, Dean JH, Dieter M. The effects of estrogens on immune responses. *Int J Immunopharmacol* 1982;4:361. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(82\)90377-0](https://doi.org/10.1016/0192-0561(82)90377-0).

MacDougall C, Polk RE. Antimicrobial stewardship programs in health care systems. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:638–56. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.638-656.2005>.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

Manning AJ, Kuehn MJ. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* 2011;11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>.

Martínez-Martínez L. Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26:481–4. <https://doi.org/10.1157/13127451>.

Martínez JL. Mechanisms of action and of resistance to quinolones. *Antibiot Drug Resist*

2019;01805:39–55. <https://doi.org/10.1002/9781119282549.ch2>.

Martínez JL, Blázquez J, Baquero F. Non-canonical mechanisms of antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:1015–22. <https://doi.org/10.1007/BF02111820>.

Menon V, Thomas R, Ghale AR, Reinhard C, Pruszk J. Flow cytometry protocols for surface and intracellular antigen analyses of neural cell types. *J Vis Exp* 2014:1–11. <https://doi.org/10.3791/52241>.

Miró E, Vergés C, García I, Mirelis B, Navarro F, Coll P, et al. Resistencia a quinolonas y betalactámicos en *Salmonella enterica*, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:204–11. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(04\)73067-0](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73067-0).

Montoya Claramunt I, Mira O. M, Álvarez A. I, Cofré G. J, Cohen V. J, Donoso W. G, et al. Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Rev Chil Pediatr* 2009;80:48–53. <https://doi.org/10.4067/s0370-41062009000100006>.

Moreno R, Marzi S, Romby P, Rojo F. The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida* *alkS* mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res* 2009;37:7678–90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp825>.

Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012a;30:325–32. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.009>.

Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. vol. 30. 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.009>.

Nalca Y, Jansch L, Bredenbruch F, Geffers R, Buer J, Häussler S. Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: A global approach. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1680–8. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1680-1688.2006>.

Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:524–34. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>.

Navarro F, Miró E, Mirelis B. Interpretive reading of enterobacteria antibiograms. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:638–45. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.002>.

Nicolau CJ, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:19–28. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5).

Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol* 2011;49:718–21. <https://doi.org/10.1128/JCM.01773-10>.

Oliver A. Impact of dissemination of metallo- β -lactamase-producing multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* in hospitals: Present and future. *Enferm Infecc Microbiol Clin*

2009;27:255–6. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.01.003>.

Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Manuel Hernández-Molina J, Pérez-Vázquez M, et al. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Spain in 2012 2013. <https://doi.org/10.1128/AAC.01513-13>.

Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>.

Palop Larrea V, Melchor Penella A, Martínez Mir I. Reflexiones sobre la utilización de antibióticos en atención primaria. *Atención Primaria* 2003;32:42–7. [https://doi.org/10.1016/s0212-6567\(03\)78855-6](https://doi.org/10.1016/s0212-6567(03)78855-6).

Peterson AA, Hancock REW, McGroarty EJ. Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1985;164:1256–61. <https://doi.org/10.1128/jb.164.3.1256-1261.1985>.

Pino I. C, Domínguez Yévenes M, González R. G, Bello T. H, Sepúlveda A. M, Mella M. S, et al. Extended spectrum β lactamases (ESBL) production in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from Chilean hospitals belonging to VIII region. *Rev Chil Infectol* 2007;24:137–41. <https://doi.org/S0716-10182007000200008>.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.

Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1109–17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg222>.

Saier MH, Paulsen IT. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:205–13. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0246>.

Sánchez-Romero MA, Casadesús J. Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:355–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316084111>.

Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:414–21. <https://doi.org/10.1007/s100960050310>.

Superior C, Cien I, Berraquero FR. La investigación científica y la problemática de la industria farmacéutica 2003:281–301.

Tlanusta Garret M, Borders LD, Cruchfield LB, Torres-Rivera E, Brotherton D, Curtis R. Copyright ©2001. All Rights Reserved. *J Multicult Couns Devel* 2001;29:147–58.

Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:430–50. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.430-450.2003>.

Walsh TR. Emerging carbapenemases: A global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:S8. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(10\)70004-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(10)70004-2).

Woychik NA, Young RA. RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends Biochem Sci* 1990;15:347–51. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90074-L](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90074-L).

Zubkov O V., Chistikov D V., Voronenko AA. An upper bound on checking test complexity for almost all cographs. *Proc - 13th Int Symp Symb Numer Algorithms Sci Comput SYNASC 2011* 2011:323–30. <https://doi.org/10.1109/SYNASC.2011.44>.