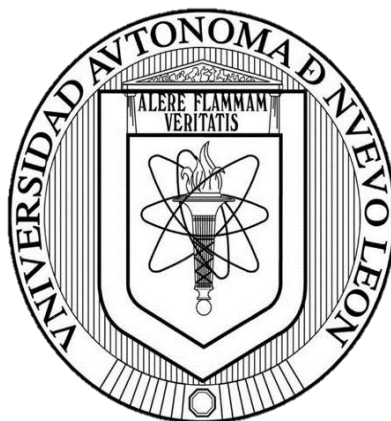


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**DESARROLLO DE TERAPIAS ANTIMICROBIANAS MEDIANTE EL
ESTUDIO DE MECANISMOS EVOLUTIVOS DE LA
MULTIRRESISTENCIA EN *ESCHERICHIA COLI*, PARA
COMBINACIONES DE LOS ANTIBIÓTICOS MEROPENEM Y
GENTAMICINA**

Por

M.C NAMI DEL ROSARIO MORALES DURÁN

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con Orientación en Microbiología Aplicada.**

Agosto, 2025

**DESARROLLO DE TERAPIAS ANTIMICROBIANAS MEDIANTE EL
ESTUDIO DE MECANISMOS EVOLUTIVOS DE LA
MULTIRRESISTENCIA EN *ESCHERICHIA COLI*, PARA
COMBINACIONES DE LOS ANTIBIÓTICOS MEROPENEM Y
GENTAMICINA**

Revisión de la tesis:

DR. JOSÉ RUBÉN MORONES RAMÍREZ
Asesor

DR. XRISTO ZÁRATE KALFÓPULOS
Comité Tutorial

DR. ANGEL LEÓN BUITIMEA
Comité Tutorial

DRA. PILAR DEL CARMEN MORALES SAN CLAUDIO
Comité Tutorial

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Sub-Directora de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo brindado con la Beca Nacional de Posgrado (No. CVU: 778847).

A la facultad de Ciencias Químicas de la UANL y al Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN) UANL, por las instalaciones prestadas.

Agradezco a mi asesor el Dr. José Rubén Morones Ramírez, por la confianza y paciencia para el desarrollo de este proyecto.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Xristo Zárate Kalfópulos, el Dr. Ángel León Buitimea y la Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio, por todas las aportaciones y el seguimiento que me brindaron para la mejora de este trabajo.

Se agradece al laboratorio de Biología Cuantitativa y de Sistemas Complejos, especialmente al Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez, por el apoyo en la parte de análisis bioinformáticos y por las instalaciones prestadas durante mi estancia de investigación.

También agradezco a la Sub-Directora de estudios de posgrado, la Dra. María Elena Cantú, por el apoyo brindado durante este proceso.

Tabla de contenido

Capítulo 1	13
1. Introducción.....	13
Capítulo 2	17
2. Antecedentes	17
Resistencia en terapias combinadas	17
Mecanismos de resistencia para terapias combinadas	23
Presión selectiva y mecanismos evolutivos en microorganismos resistentes a los antibióticos	27
<i>E. coli</i> multirresistente a los antibióticos y su impacto en la salud.....	29
Carbapenémicos y aminoglucósidos como antibióticos de interés clínico en la aparición de la RAM	30
El antibiótico Meropenem	33
Meropenem en combinación	34
Aminoglucósidos	35
Importancia de la secuenciación genómica en el entendimiento de la evolución de la RAM.	40

Capítulo 3	43
3. Aportación científica, hipótesis y objetivos	43
Aportación científica	43
Hipótesis.....	43
Objetivo	44
Objetivos particulares.....	44
Capítulo 4	45
4. Materiales y métodos	45
Cepa y condiciones microbianas (overnight).....	45
Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (MIC).....	45
Determinación de la MIC para tratamientos combinatorios de los antibióticos gentamicina y meropenem	47
Diseño de la placa de acrílico MEGA-plate de 40 x 54 cm.....	48
Estandarización.....	49
Esterilización de la placa MEGA-plate y medios de cultivo	49
Inoculación de la bacteria <i>E. coli</i>	50
Selección de fenotipos resistente.....	50

Tinción de Gram.....	51
Extracción y secuenciación del ADN.....	51
Procesamiento de las secuencias y análisis bioinformáticos	52
Determinación de las matrices de presencia y ausencia de los ARGs del desafío con meropenem y gentamicina.....	53
Capítulo 5	57
5. Resultados	57
Estandarización de placa MEGA-plate	57
MIC de los antibióticos meropenem y gentamicina	58
Crecimiento de la MEGA-plate para el antibiótico meropenem	58
Colecta de cepas evolucionadas.....	59
Fenotipo de las cepas resistentes al antibiótico meropenem	61
Crecimiento de la MEGA-plate para el antibiótico gentamicina.....	66
Fenotipo de las cepas resistentes al antibiótico gentamicina	67
Crecimiento de la MEGA-plate para la combinación de los antibióticos meropenem y gentamicina	72
6. Fenotipo de las cepas resistentes a los antibióticos en combinación	73

.....	75
Análisis bioinformáticos de la MEGA-plate con el desafío de los antibióticos meropenem y gentamicina.	80
Meropenem, gentamicina y florfenicol.....	87
Funciones biológicas.....	89
Capítulo 6	93
7. Discusión.....	93
Capítulo 7	110
8. Conclusión	110
ANEXO I	112
ANEXO II	127
capítulo 8	132
9. Referencias	132

Lista de figuras

Figura 1. Diseño de la placa Mega-plate con el software AutoCAD (versión 2023).....	48
Figura 2. En a) y b) se puede observar los linajes que formaron de la bacteria <i>E. coli</i> , al ir creciendo en el medio LB, c) estratificación de las 3 capas de medio en el refractario.	57
Figura 3. Placa de meropenem con las diferentes concentraciones del antibiótico meropenem.....	59
Figura 4. Placa de meropenem con los puntos de muestra marcados que se tomaron.....	60
Figura 5. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> en medio LB líquido y sólido a las diferentes concentraciones que se probaron.	61
Figura 6. a) Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 1 sin antibiótico, b) crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 2 con 0.125 µg/ml del antibiótico meropenem.....	62
Figura 7. a) Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 3 con 1.25 µg/ml del antibiótico, b) crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 4 con 12.5 µg/ml del antibiótico meropenem.....	62
Figura 8. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 5 con 125 µg/ml del antibiótico meropenem.....	63
Figura 9. Tinción de Gram de las muestras obtenidas del carril 1 sin antibiótico y <i>E. coli</i> control. MER=meropenem, C1 corresponde al carril 1 sin antibiótico M= N° de muestra del mismo carril.	64
Figura 10. Tinción de Gram de las muestras obtenidas del carril 2. MER=meropenem, C2 corresponde al carril 2 y M= N° de muestra del mismo carril.	65
Figura 11. Tinción de Gram de las muestras obtenidas de los carriles 3, 4 y 5. MER=meropenem, C3, C4 y C5 corresponden a los carriles 3, 4 y 5, M= N° de muestra del mismo carril.	65

Figura 12. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> después de 13 días de exposición al antibiótico gentamicina.....	66
Figura 13. Placa de gentamicina con los puntos de muestra que se tomaron.	67
Figura 14. a) Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 1 sin antibiótico, b) crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 2 con 4 µg/ml de antibiótico.	68
Figura 15. a) Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 3 con 40 µg/ml, b) crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 4 con 400 µg/ml del antibiótico gentamicina.....	68
Figura 16. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 5 con 4,000 µg/ml del antibiótico gentamicina.	69
Figura 17. Tinción de Gram de las muestras obtenidas de los carriles 1, 2 y 3. GEN=gentamicina, C= N° de carril, M= N° de muestra del mismo carril.	70
Figura 18. Tinción de Gram de las muestras obtenidas de los carriles 3 y 5. GEN=gentamicina, C= N° de carril, M= N° de muestra del mismo carril.	71
Figura 19. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> después de 22 días de exposición a los antibióticos meropenem y gentamicina en combinación.	72
Figura 20. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 1 sin antibiótico.....	73
Figura 21. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 2 con el antibiótico meropenem y gentamicina en combinación.....	74
Figura 22. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 3 con el antibiótico meropenem y gentamicina en combinación.....	75
Figura 23. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 1 sin antibiótico. C1= N° de carril, M= N° de muestra.	76
Figura 24. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 1 sin antibiótico. C1= N° de carril, M= N° de muestra.	76
Figura 25. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 1 sin antibiótico. C1= N° de carril, M= N° de muestra.	77
Figura 26. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 2 con antibiótico. C2= N° de carril, M= N° de muestra.	78

Figura 27. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 3 con antibiótico. C3= N° de carril, M= N° de muestra.	78
Figura 28. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> del carril 3 con antibiótico. C3= N° de carril, M= N° de muestra.	79
Figura 29. Mapa de calor de las 8 muestras obtenidas con el antibiótico meropenem.....	81
Figura 30. Red de asociación de las 8 muestras de meropenem M= Número de muestra.....	82
Figura 31. Mapa de calor de las 10 muestras obtenidas con el antibiótico gentamicina.....	85
Figura 32. Red de asociación de las 10 muestras del antibiótico M= Número de muestra.....	86
Figura 33. Mapa de calor que muestra la presencia de genes de resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i> con los antibióticos meropenem, gentamicina y florfenicol. Los cuadros en rojo representan la presencia de un gen de resistencia en los antibióticos analizados, mientras que los cuadros en azul representan la ausencia de un gen de resistencia.....	88
Figura 34. Funciones biológicas asociadas a los ARGs obtenidos del desafío con el antibiótico meropenem.	90
Figura 35. Funciones biológicas asociadas a los ARGs obtenidos del desafío con el antibiótico gentamicina.	91
Figura 36. Funciones biológicas asociadas a los ARGs obtenidos del desafío con el antibiótico florfenicol.....	91
Figura 37. Funciones biológicas asociadas a los ARGs obtenidos de los antibióticos meropenem gentamicina y florfenicol.....	92
Figura 38. Funciones biológicas asociadas a los 22 ARGs que comparten los antibióticos meropenem gentamicina y florfenicol.....	92

RESUMEN

Nami del Rosario Morales Durán

Fecha de Graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del estudio: DESARROLLO DE TERAPIAS ANTIMICROBIANAS
MEDIANTE EL ESTUDIO DE MECANISMOS EVOLUTIVOS DE LA
MULTIRRESISTENCIA EN *ESCHERICHIA COLI*, PARA
COMBINACIONES DE LOS ANTIBIÓTICOS MEROPENEM Y
GENTAMICINA**

Número de páginas: 171

**Candidato para el grado de
Doctorado en Ciencias con
Orientación en Microbiología
Aplicada**

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método de Estudio: La resistencia a los antibióticos es un problema de interés global que se ha vuelto cada vez más relevante. Las terapias combinadas, tienen ventajas significativas sobre la monoterapia para tratar infecciones causadas por microorganismos que presentan resistencia y multirresistencia. Sin embargo, se han realizado diversos trabajos que destacan la complejidad y las posibles implicaciones que su implementación puede generar en el aumento de este problema. Pocos estudios presentan un enfoque evolutivo, en el cual se proporcionan escenarios donde es posible la aparición de resistencia en terapias combinadas. En este trabajo se realizó el

análisis de la resistencia a los antibióticos meropenem y gentamicina tanto en combinación como por separado, desde una perspectiva evolutiva utilizando el sistema modificado de la MEGA-plate. Se encontró la presencia de 57 ARGs para el antibiótico meropenem y 37 ARGs para el antibiótico gentamicina, además se realizó la comparación con el antibiótico florfenicol que es de uso veterinario. Esta comparación nos mostró que estos 3 grupos de antibióticos comparten 22 ARGs. Las bacterias evolucionadas presentaron cambios a nivel morfológico y las cepas desafiadas con el antibiótico meropenem presentaron variación en el número de ARGs a lo largo de todo el desafío. También se determinaron las funciones biológicas en las cuales los ARGs están relacionados. **Contribuciones y conclusiones:** Se encontró que la bacteria *E. coli* cuenta con una gran plasticidad para montar diferentes respuestas tanto fenotípicas como genotípicas cuando se expone a diversos antibióticos. Además, se destacó la importancia de los ARGs no solo en la adquisición de la resistencia, sino también en funciones biológicas cruciales para los microorganismos. Por otro lado, se demostró que existe un grupo de 22 genes para tres familias de antibióticos que podrían ser clave para entender este problema en terapias futuras.

FIRMA DEL ASESOR: _____

Dr. José Rubén Morones Ramírez

CAPÍTULO 1

1. Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se ha convertido en un grave problema sobre todo para la salud pública a nivel mundial. En la actualidad cerca de 700,000 personas mueren al año por causa de la RAM, y se estima que para el 2050 se tendrá un incremento considerable en el número de muertes (Aslam et al., 2018; O'NEILL, 2014). A pesar de que es un problema reconocido y de gran interés, la incidencia y propagación de los microorganismos multirresistentes a los antibióticos (MDR) sigue en aumento. Diversos estudios se han enfocado en la creación de estrategias para combatir este problema, que se basan principalmente en la mejora de los antibióticos ya existentes y en la creación de nuevos fármacos o coadyuvantes (Chellat et al., 2016). Por otro lado, se ha incrementado el desarrollo de nuevos antibióticos mediante compuestos orgánicos, así como el uso de terapias combinadas. Éstas últimas han generado una gran controversia acerca de su uso, por el posible aumento en las tasas de resistencia y los efectos adversos, así como el incremento en la aparición de enfermedades asociadas y en los costos del tratamiento (Tamma et al., 2012). No obstante, también se han demostrado beneficios con su aplicación, ya que diversos estudios han obtenido mejores resultados en los tratamientos con las terapias combinadas que con el uso de las monoterapias, tales como; menor riesgo de adquirir RAM,

uso de dosis más bajas y tratamientos más cortos para combatir a microorganismos de interés clínico (Chey et al., 2017; Coates et al., 2020; Ford et al., 2016; Kerantzas and Jacobs, 2017; Kim et al., 2020; Liu et al., 2018; Orkin et al., 2020). Sin embargo, estos estudios no incluyen la dinámica evolutiva y la trayectoria genética que podrían estar interviniendo en el uso de estas terapias, lo cual contribuiría al mejoramiento de la problemática que representa la RAM, así como la prevención del surgimiento de enfermedades emergentes (Knöppel et al., 2014). Se sabe que el uso excesivo de los antibióticos ha acelerado la diseminación de las bacterias que evolucionaron para soportar a estos fármacos, a través de la adquisición de genes o mutaciones cromosómicas que les confieren resistencia y se ha extendido a entornos clínicos y ambientales, lo que proporciona un buen reservorio para su propagación (Durão et al., 2018). Más allá de los complejos procesos que ha desencadenado la RAM, el surgimiento y la diseminación de la misma en poblaciones bacterianas depende de parámetros evolutivos clave, como: la velocidad a la que las bacterias adquieren resistencia, las presiones selectivas a favor y en contra de los MDR, la tasa y los efectos de las mutaciones que compensan los potenciales costos de la RAM, entre otros (Durão et al., 2018). Otro aspecto importante que afectan la trayectoria evolutiva de la resistencia son las características fenotípicas y genotípicas *per se* de los microorganismos incluyendo la capacidad de adaptarse a diversos desafíos ambientales ya que se ha demostrado que la RAM, aumenta constantemente en distintos linajes

(Baym et al., 2016; Kerek et al., 2024). También se ha considerado que la exposición a los antibióticos no sólo en grandes cantidades sino también en concentraciones bajas, es un propulsor para la aparición de la RAM (Ching and Zaman, 2020).

Comprender los mecanismos evolutivos que rigen la aparición de la RAM es fundamental para determinar el papel que juegan los genes relacionados con la RAM sobre todo aquellos que se encuentran presentes en el cromosoma, ya que se ha demostrado que cumplen con diversas funciones que no solo están relacionadas con la respuesta a los antibióticos (Benveniste and Davies, 1973; Bulgakova et al., 2014; Doyle et al., 1991; Martinez et al., 2009, 2009). Como es el caso de las bombas de eflujo, ya que éstas presentan funciones relacionadas con el transporte de moléculas involucradas en la señalización, la desintoxicación de intermediarios metabólicos, entre otros (Martinez et al., 2009). Se ha sugerido que los genes de las bombas de eflujo codificados en el cromosoma, son genes evolutivamente antiguos importantes en la fisiología de los microorganismos por lo que sus funciones van más allá de la adquisición de la RAM (Neyfakh et al., 1991). Entender la estrecha relación entre los antibióticos y el papel en las funciones biológicas en las cuales están involucrados los genes relacionados con la RAM, ayudaría a tener una perspectiva más clara sobre la aparición de la RAM y la MDR sobre todo con la respuesta que puedan tener los microorganismos a antibióticos de importancia clínica (Elshamy and Aboshanab, 2020). El objetivo de este

trabajo fue descifrar la trayectoria genotípica y fenotípica de la bacteria *E. coli* bajo la influencia del antibiótico meropenem y gentamicina tanto en combinación como por separado, mediante el uso del sistema MEGA-plate y compararlos con el antibiótico florfenicol que es de gran relevancia en la medicina veterinaria, además de descubrir las funciones biológicas a las cuales los genes de resistencia (ARGs) están relacionados.

CAPÍTULO 2

2. Antecedentes

Resistencia en terapias combinadas

Las terapias combinadas son el mejor tratamiento para enfermedades provocadas por patógenos de interés mundial, como en el caso de la bacteria *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis, debido a que se ha presentado un drástico aumento en el número de casos de pacientes portadores de *M. tuberculosis* multirresistente. Desde la aparición de la resistencia a la monoterapia con el antibiótico estreptomina y la posterior resistencia a los antibióticos isoniazida y la rifampicina, que se utilizaban con mayor frecuencia para contrarrestar a este patógeno (Gillespie, 2002; Müller et al., 2013). Ha provocado que para el tratamiento de esta infección, se requiera de un mínimo de tres a cuatro antibióticos en combinación (Dartois and Rubin, 2022). La RAM y MDR que presenta la bacteria *M. tuberculosis*, se debe principalmente a las mutaciones espontáneas en polimorfismos de un solo nucleótido mejor conocidos como SNP (McGrath et al., 2014) y están relacionadas directamente con las mutaciones en los genes *inhA*, *rrs*, *gyrA*, *gyrB*, *rpoB*, *pncA*, *embB*, *ahpC*, *katG*, *ndh*, *furA*, y *rpsL* para los antibióticos pirazinamida, rifampicina, isoniazida, etambutol estreptomina, capreomicina y para los antibióticos fluoroquinolonas respectivamente (Jeanes y O'Grady,

2016; Lorenzo and Mousa, 2011; Nguyen et al., 2019; Volokhov et al., 2009). Aunque las pruebas que se han realizado de fluctuación en las mutaciones de los ARGs para estos antibióticos, surgen de manera espontánea en un aproximado de 10^{-6} a 10^{-9} dependiendo del antibiótico empleado, se estima que la probabilidad de que aparezca la resistencia para dos antibióticos es aproximadamente de 10^{-16} (Colijn et al., 2011). A pesar de que la probabilidad es baja, a medida que la población de bacterias sensibles a los antibióticos disminuye se da un incremento en la población resistente, y da pauta para la aparición de resistencia a un segundo antibiótico y por consiguiente, la exposición a un segundo antibiótico, provoca la selección de bacterias doblemente resistentes (Colijn et al., 2011). Se sabe que la diversidad genotípica y las diferentes mutaciones que presenta esta bacteria, resaltan la existencia de diversos caminos evolutivos que conllevan a la RAM y a la MDR que aún faltan por investigar (Nguyen et al., 2017).

La bacteria *Helicobacter pylori*, se caracteriza por ser un patógeno que provoca las enfermedades infecciosas más comunes en el mundo, se estima que más del 50% de la población mundial ha sido infectada con este patógeno, principalmente en países en desarrollo (Hooi et al., 2017). Además, está relacionada con la presencia de carcinogénesis gástrica, debido a la producción de diferentes factores de virulencia que conducen a la úlcera péptica y al cáncer gástrico (Sukri et al., 2020). El tratamiento de *H. pylori* incluye inhibidores de la bomba de protones (IBP) en conjunto con diferentes

regímenes de tratamiento (Malfertheiner et al., 2017). En la terapia triple, se suelen administrar antibióticos de primera línea como amoxicilina y claritromicina junto con un IBP. Se ha demostrado que en los pacientes que presentan resistencia a claritromicina, se emplea como alternativa, el antibiótico metronidazol y en determinados casos que se presenta la multirresistencia, se utiliza la terapia cuádruple que contiene bismuto (Malfertheiner et al., 2017). La claritromicina es un antibiótico que tiene gran relevancia para el tratamiento de *H. pylori*, la resistencia que presenta la bacteria para este antibiótico se debe a la presencia de las mutaciones A2146G y A2147G en el gen 23S rRNA (Iwamoto et al., 2014). Por otro lado, ya se ha demostrado que el gen *hefA* de la bomba de eflujo, juega un papel importante en la resistencia a múltiples antibióticos en *H. pylori* (Liu et al., 2008). También las cepas multirresistentes tanto para las terapias triples y cuádruples presentan mutaciones asociadas a los genes 23S rRNA, 16S rRNA, *gyrA* y *rpoB*, estos genes se encontraron exclusivamente en aislados de pacientes que ya habían sido tratados sin éxito en múltiples ocasiones (Wueppenhorst et al., 2009). Como ya se ha mencionado, para el tratamiento de estos patógenos de interés mundial, se requiere la implementación de terapias combinatorias triples y cuádruples, debido a que la monoterapia y la terapia con dos antibióticos ya no es una opción. Aunque la probabilidad de presentar resistencia sea estadísticamente baja, esto no quiere decir que no estemos ejerciendo una mayor presión selectiva en los patógenos, y a la larga,

provoque el desarrollo de resistencia a las terapias combinadas como sucedió con las monoterapias en las bacterias *H. pylori* y *M. tuberculosis*, por ello se requieren estudios que se desarrollen en un contexto evolutivo, para poder contribuir al entendimiento de la dinámica adaptativa en la RAM y la MDR y así poder prevenir mayores complicaciones con el uso de terapias combinadas, puesto que en la actualidad son la mejor estrategia para combatir a los patógenos resistentes y multirresistentes (Lázár et al., 2014).

Sabemos que el incremento de la prevalencia de las bacterias multirresistentes, ha disminuido la eficacia de los tratamientos convencionales, por lo que se han buscado alternativas que mejoran los métodos tradicionales como en el caso de la monoterapia y las terapias combinadas con antibióticos (Allahverdiyev et al., 2011). Las nanopartículas metálicas son un nuevo método que han mostrado tener buenos resultados en combinación con antibióticos, ya que suelen ser eficientes al reducir la dosis altas y la toxicidad que se puede presentar al usarlas por separado (Allahverdiyev et al., 2011). También se ha demostrado que la combinación de las nanopartículas con antibiótico, mejora en gran medida la capacidad bactericida y se da una re-sensibilización de las bacterias resistentes a un determinado antibiótico, por lo que son considerados tratamientos eficientes y novedosos con resultados prometedores (Baptista et al., 2018; Fan et al., 2022; Garza-Cervantes et al., 2020; Hochvaldová et al., 2022; N.-Y. Lee et al., 2019; Mba and Nweze, 2021).

No obstante, aunque su implementación se ha desarrollado en las últimas décadas, ya se han reportado estudios en donde ya existe la presencia de resistencia para estos materiales. Graves et al. (2015) realizó un estudio evolutivo en el que demostró que las bacterias pueden desarrollar resistencia a las nanopartículas de plata (AgNP), mediante la presencia de mutaciones simples sobre todo en los genes *crl*, *gatC*, *glpR*, *gltP*, *yjcO*, y mencionan que se debe tener cuidado con el uso de las nanopartículas en comunidades bacterianas y la exposición prolonga a las mismas mediante productos de uso común. Debido a que su aplicación se ha incrementado en los últimos años, se estima que el mercado mundial de los productos que se basan en el uso de la nanotecnología tiene un incremento del 25% anual. Tan sólo para el 2020, la producción anual fue de aproximadamente 58,000 toneladas a nivel global, esto conlleva a una liberación de nanomateriales en cantidades importantes al medio ambiente, especialmente para los nanomateriales basados en plata (Ag), ya que ha sido uno de los productos mayormente comercializados por sus propiedades antimicrobianas (Gunawan et al., 2017; Zhang et al., 2020).

A lo largo de la historia se ha visto que sin importar la eficacia del tratamiento empleado, los microorganismos han desarrollado estrategias para combatir a los nuevos desafíos antimicrobianos que se han desarrollado para contrarrestarlos, con la finalidad de seguirse manteniéndose en la carrera evolutiva (Mba and Nweze, 2021). Gran parte se debe a la plasticidad, a la gran capacidad de generar mutaciones y a la adquisición de ARGs por parte

de las bacterias, aunado a la presión selectiva que se ha ejercido sobre estos microorganismos desde la aparición de los antibióticos y a las nuevas alternativas antimicrobianas (Graves et al., 2015; Mba and Nweze, 2021; Niño-Martínez et al., 2019). Inclusive en el caso de las nanopartículas, se ha demostrado que ni siquiera se requieren cambios genéticos para adquirir resistencia, basta con realizar pequeñas modificaciones en el fenotipo. Un estudio realizado en las bacterias *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, con nanopartículas de plata (NPs-Ag) se determinó que las bacterias pueden desarrollar resistencia a las (NPs-Ag) posterior a una exposición constante, la resistencia fue provocada por un aumento en la producción de la proteína flagelina, lo que con lleva a que las (NPs-Ag) se agreguen y pierdan su efecto antimicrobiano; se determinó que no hubo alteraciones significativas en los genes flagelares (*fliC*, *fLgE*, *fliD*), en el gen que codifican para el gen maestro regulador transcripcional (FlhDC) y para el gen regulador flagelar (FliA) entre las cepas que presentaron resistencia y las cepas control, únicamente se presentó la resistencia por un aumento en la producción de la proteína flagelina (Panáček et al., 2018).

Mecanismos de resistencia para terapias combinadas

La efectividad de las terapias combinadas se basa en la poca frecuencia que aparece la RAM simultánea a diferentes fármacos (Berríos-Caro et al., 2021). No obstante, la evolución de la resistencia a múltiples antibióticos puede estar relacionada con las terapias combinadas y su efecto benéfico para contrarrestar la RAM. Angst et al. (2021) realizaron estudios epidemiológicos *in vitro* y bioinformáticos en donde demostraron las ventajas del uso de las terapias combinadas. En su trabajo mencionan que mientras no se presente la aparición de una doble resistencia por parte de las bacterias, la terapia combinada es mejor opción que el uso de la monoterapia. Se ha determinado que aunque la probabilidad de que aparezca una doble mutación es baja, aparece cuando ocurren mutaciones que confieren resistencia de manera independiente para la administración de un solo antibiótico, y la posterior administración simultánea de un tratamiento combinado, aunado a los estudios relacionados con los mecanismos de resistencia de los patógenos, se tiene que tomar en cuenta lo complejo que es la dinámica y la cinética entre las interacciones de los diferentes antibióticos, ya que esto puede generar una mayor problemática (Angst et al., 2021; Trindade et al., 2009; Vestergaard et al., 2016).

Los cambios genéticos sobre todo las mutaciones que confieren RAM y MDR en los microorganismos son costosas, por causa de los efectos negativos que aparecen en la aptitud bacteriana (Trindade et al., 2009). Sin embargo, estudios de competencia microbiana han demostrado que el costo de la resistencia a un antibiótico depende de la presencia de alelos que también confieran resistencia para otros antibióticos. Trindade et al. (2009) menciona que cuando se utilizan terapias combinadas, la epistasis positiva puede provocar la aparición de la doble resistencia en microorganismos; específicamente en mutaciones puntuales. La epistasis suele ocurrir cuando la expresión de un determinado fenotipo en un locus depende de diversas mutaciones que están presentes en otros loci, es por ello que ha tomado gran relevancia en el caso de la evolución y aparición de la RAM (Trindade et al., 2009). Se sabe que determinadas combinaciones alélicas, terminan en compensaciones rápidas, lo cual explica porque las bacterias que presentan multirresistencia son frecuentes, esto puede estar ligado a la implementación del uso de las terapias combinadas (Trindade et al., 2009).

Vestergaard et al. (2016) realizó un estudio evolutivo de la bacteria *P. aeruginosa*, en donde se probó la monoterapia y la terapia combinada de los antibióticos ceftazidima y la ciprofloxacina. Las mutantes que desarrollaron resistencia posterior a la exposición a un solo antibiótico, se eligieron para el tratamiento combinado de ambos antibióticos y encontraron que este último,

seleccionó cepas mutantes que expresaron mecanismos de resistencia de amplio espectro con mejoras en la aptitud bacteriana.

Berríos-Caro et al. (2021) utilizaron modelos matemáticos para comparar diferentes métodos de crecimiento (Exponencial, logarítmico y sin competencia por recursos) tanto para la monoterapia como para la terapia con dos o más antibióticos y encontraron que cuando los recursos son escasos, aunado a la competencia entre bacterias, se ve afectada la aparición de un solo tipo de resistencia, mientras que la doble resistencia se expresa más en el crecimiento sin competencia por recursos. Sin embargo, la doble resistencia se produce a partir de la aparición de los microorganismos que presentan resistencia simple, es decir a un solo antibiótico. Aunque sólo se hayan hecho estimaciones con modelaciones matemáticas, éste trabajo resalta que existe la posibilidad de la aparición de una doble resistencia cuando se utilizan terapias combinadas bajo ciertas condiciones, que pueden ser provocadas por factores intrínsecos y extrínsecos tanto del organismo huésped como del patógeno *per se* y de los antibióticos que se utilizan.

Otro enfoque a considerar para el tratamiento de las terapias combinadas, es la búsqueda de efectos sinérgicos entre antibióticos, así como potenciar su actividad en microorganismos de interés clínico; es por ello que se han realizado diversos trabajos enfocados encontrar estas características en las terapias combinadas (Barbee et al., 2014; Coates et al., 2020; Ni et al.,

2016; Terbtthakun et al., 2021). Por otro lado, se ha demostrado que la sinergia puede tener efectos opuestos en la RAM, debido a que promueve la eliminación de los patógenos con mayor rapidez y con ello reduce el tiempo en el cual los microorganismos pueden generar mutaciones que les confieran multirresistencia (Torella et al., 2010). No obstante, esto promueve la selección de resistencia a un solo antibiótico (Torella et al., 2010) y como se mencionó anteriormente, en determinadas condiciones, éste fenómeno puede propiciar que surja una doble resistencia en el cual, las terapias combinadas ya no tendría efecto sobre los patógenos (Berríos-Caro et al., 2021).

Munck et al. (2015) demostraron que el desarrollo de la RAM se ve alterado a causa de la sensibilidad colateral, además de que las interacciones de los antibióticos cambian cuando los microorganismos patógenos desarrollan RAM, generando un menor efecto sobre la adaptación microbiana en mayor tiempo. Su estudio se basó en la evolución adaptativa de la bacteria *E. coli*, a 5 diferentes antibióticos y a 10 combinaciones en pares (clorhidrato de Cip, clorhidrato de Tet, sulfato de Amk, Chl y sulfato de Pip) y demostraron que una combinación específica de antibióticos puede reducir la evolución de la RAM y mencionan que la sensibilidad colateral entre antibióticos, potencia la evolución de la RAM en terapias combinadas, debido a que la sensibilidad y la resistencia que se producen de manera colateral, se presentan cuando las mutaciones que confieren resistencia a un antibiótico aumenta o reduce la sensibilidad hacia otro antibiótico (Munck et al., 2015).

Lázar et al. (2014), realizaron estudios evolutivos y genéticos en la bacteria *E. coli* para el tratamiento de 12 antibióticos solos y en combinación, y determinaron que la evolución en la parte genética prevalece en los diferentes tratamientos posterior a una primera exposición, además de que la resistencia cruzada entre la interacción de dos antibióticos es independiente de la presencia de sinergia entre ambos. Sin embargo, la evolución hacia la multirresistencia fue frecuente bajo la presión de un solo antibiótico y mencionan que las interacciones evolutivas que pueden estar influyendo en los tratamientos combinados y la multirresistencia, se rigen por distintos mecanismos, por lo que es importante considerarlos en el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas.

Presión selectiva y mecanismos evolutivos en microorganismos resistentes a los antibióticos

La evolución de los microorganismos resistentes se puede considerar un fenómeno natural, que se desencadena a través de la presión selectiva que se ejerce sobre una determinada población de microorganismos (Palmer and Kishony, 2013). No obstante, en los últimos años esta presión se ha visto alterada por el uso excesivo de los antibióticos, y ha provocado que aparezcan nuevos mecanismos de resistencia en microorganismos patógenos (Klein et al., 2018). Un estudio realizado del 2000 al 2015 en 76 países, demostró que el consumo de antibióticos en dosis diarias, incrementó un 65%, mientras que

la tasa de consumo presentó un incremento del 39% y se predijo que para el 2030 sin cambios en los regímenes de consumo, estos valores tendrán un aumento de más del 200% a nivel mundial (Klein et al., 2018).

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) constituyen un mecanismo clave de la RAM en las bacterias Gram negativas, y diversos estudios las han tomado como modelo para entender la evolución en tiempo real de la RAM. Por ejemplo, en el caso de la β -lactamasas CTX-M, se utilizó una combinación de enfoques filogenéticos y moleculares para establecer las trayectorias evolutivas de la resistencia, demostrando que los antibióticos cefotaxima y ceftazidima actuaron como fuerzas selectivas para impulsar la diversificación de la enzima β -lactamasas CTX-M, fomentando la RAM para estos fármacos; este fenómeno se presentó únicamente cuando estaban presentes los dos antibióticos (Novais et al., 2010). Por otro lado, la RAM puede evolucionar a través de la acumulación de múltiples mutaciones, esto se ha demostrado en la bacteria *E. coli*, en la cual se analizaron las trayectorias evolutivas de los antibióticos cloranfenicol, la doxiciclina y la trimetoprima durante un periodo de exposición de 20 días, y se encontró que la resistencia aumentó drásticamente con trayectorias fenotípicas similares, mientras que los análisis genéticos revelaron cambios generales y también específicos para cada fármaco, lo cual sugiere que descubrir la trayectoria genética puede ayudar a entender la propagación de la RAM en microorganismos patógenos (Toprak et al., 2011). Otro aspecto importante que afecta la trayectoria

evolutiva, es la capacidad de adaptación a través de la migración con diferentes desafíos ambientales (Baym et al., 2016). En el 2016 se realizó un estudio en el cual se construyó un dispositivo experimental llamado Microbial Evolution and Growth Arena (MEGA-plate) por su nombre en inglés. El cual permitió la observación visual y genotípica de la adaptación de la bacteria frente al desafío con el antibiótico trimetoprima, demostrando que la resistencia aumentaba constantemente en los linajes de la bacteria *E. coli* y se observó la diversificación fenotípica y genotípica hacia la RAM en la bacteria (Baym et al., 2016).

***E. coli* multirresistente a los antibióticos y su impacto en la salud**

Los MDR tienen un gran impacto en el sector salud, tan solo para la Unión Europea se ha reportado que causan más de 33,000 muertes al año, de las cuales la gran mayoría son provocadas por pocas especies de microorganismos como es el caso de la bacteria *E. coli* multirresistente, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp.* y *Klebsiella pneumoniae* (Kakoullis et al., 2021). Estos MDR presentan diferentes mecanismos de RAM dentro de los que se destacan: la modificación, inactivación y la expulsión del fármaco (Reygaert, 2018).

La bacteria *E. coli* es resistente a una gran variedad de agentes antimicrobianos que se catalogan como clínicamente relevantes, además de que posee una alta capacidad para adquirir y acumular ARGs (Redondo-Salvo

et al., 2020). Se ha demostrado que los mecanismos de resistencia de mayor preocupación que presenta esta bacteria, se basan en genes que codifican para las β -lactamasas de espectro extendido, las carbapenemasas, las cefalosporinas, las 16s rRNA metilasas, la resistencia a las quinolonas mediada por plásmidos, entre muchos otros (Kakoullis et al., 2021). La Organización Mundial de la Salud publicó en 2017 la lista de los principales microorganismos de interés, para las cuales se requieren de la creación de nuevos fármacos para combatir los MDR. La lista tiene una clasificación basada en la necesidad de la creación de nuevas alternativas para combatir a estos patógenos, siendo la mayoría bacterias Gram negativas. Como prioridad crítica se encuentran *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a los carbapenémicos (Breijyeh et al., 2020). Como se ha demostrado, *E. coli* es resistente a casi todos los agentes antimicrobianos, lo que la convierte en un patógeno de gran interés para el sector clínico y un excelente modelo para el estudio de la RAM (Poirel et al., 2018).

Carbapenémicos y aminoglucósidos como antibióticos de interés clínico en la aparición de la RAM

Los carbapenémicos son antibióticos β -lactámicos. Cuentan con una estructura que se define por un carbapenem que se encuentra acoplado a un anillo betalactámico que le brinda protección contra la acción de las enzimas

β -lactamasas, éste acople es lo que les da la capacidad de ser antibióticos de espectro extendido. (Aslam et al., 2020; Papp-Wallace et al., 2011) Su mecanismo de acción se basa en la penetración de la pared celular de las bacterias y en la unión con las proteínas fijadoras de penicilina (PFP), con ello provocan la inactivación de las enzimas autolíticas intracelulares provocando la muerte de la bacteria. Otra característica importante es que suelen dirigirse a la enzima de inhibición de la transpeptidasa en el proceso de síntesis de la pared celular y con ello, evitan que se dé el entrecruzamiento de los péptidos provocando una mayor actividad autolítica en la bacteria (Aslam et al., 2020). Los carbapenémicos son los antibióticos con mayor uso en el sector clínico, debido a que poseen un espectro amplio con gran efectividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo el imipenem y el meropenem los más prescritos (Breijyeh et al., 2020; Elshamy and Aboshanab, 2020).

Se ha demostrado la eficacia de los tratamientos combinados de los antibióticos carbapenémicos con otros agentes antimicrobianos, no obstante, estos resultados siguen siendo controversiales porque también puede generar un efecto negativo al aumentar la RAM en los microorganismos (Assimakopoulos et al., 2019; Doi, 2019; Park et al., 2016; Paul et al., 2014; Savoldi et al., 2021; Schmid et al., 2019). Los carbapenémicos presentan un espectro antimicrobiano más amplio que las combinaciones de penicilinas, cefalosporinas e inhibidores de β -lactámicos (Basseti et al., 2009). Se sabe que el imipenem y el panipenem son antibióticos importantes contra las

bacterias Gram positivas, y el meropenem, biapenem, ertapenem y doripenem suelen ser más efectivos contra los organismos Gram negativos (Bassetti et al., 2009; Salmon-Rousseau et al., 2020). Los principales mecanismos de resistencia que se han reportado para los carbapenémicos son: la producción de enzimas carbapenemasas, las bombas de eflujo y las mutaciones relacionadas con las pérdidas de las porinas, provocando que la bacteria sea privada de los portadores que permiten la entrada del antibiótico a través de la membrana externa (Durante-Mangoni et al., 2019).

Los genes que confieren los mecanismos de resistencia a los antibióticos en las bacterias se encuentran en el cromosoma o en los plásmidos. En el caso de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, se han detectado diversos ARGs que confieren resistencia a los carbapenémicos como el gen *bla NDM*, *bla VIM* y *bla NDM* (Nagaraj et al., 2012). También se han encontrado ARGs y mutaciones para las cefalosporinas, carbapenémicos y quinolonas en cepas de *E. coli*, como es el caso de los genes *el bla TEM* y *bla CTX-M*. La resistencia a quinolonas se debió a mutaciones en los genes *gyr A* y *par C*, así como la presencia del gen *NDM-1* para los carbapenémicos (Chandran et al., 2014).

El antibiótico Meropenem

El meropenem es un antibiótico betalactámico que pertenece a la clase de los carbapenémicos de espectro extendido y baja citotoxicidad, es uno de los más prescritos para el tratamiento de infecciones en donde se presenta la RAM y la MDR. Se considera un antibiótico dependiente del tiempo y su acción se basa en la inhibición de la pared celular, por lo que inhibe el crecimiento y provoca la muerte del patógeno (Steffens et al., 2021). Los antibióticos que dependen del tiempo de administración, son aquellos que superan la concentración mínima inhibitoria (MIC) en el sitio de la infección, es decir, entre más tiempo permanezca una concentración superior a la MIC en el torrente sanguíneo de los pacientes, mayor será la posibilidad de éxito en contrarrestar la infección (Steffens et al., 2021). El meropenem ha demostrado ser eficaz contra diversos patógenos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* como; *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, entre muchos otros, por lo que resalta su importancia en el uso clínico en humanos (Baldwin et al., 2008).

Meropenem en combinación

Un estudio realizado con el compuesto Equol y el antibiótico meropenem en combinación contra las bacterias *E. coli* resistente a los carbapenémicos, confirmaron que los genes *blaKPC* y *blaOXA-48* y algunos otros genes de carbapenemasas son la causa de que estos microorganismos presenten resistencia (Kim and Eom, 2021). Sus resultados demostraron que el compuesto Equol fue capaz de restaurar la susceptibilidad en *E. coli* para el antibiótico meropenem, y además de suprimir significativamente los niveles de transcripción de los genes relacionados con las carbapenemasas, de mostrando que el Equol tiene un efecto sinérgico y puede ser un buen coadyuvante para el meropenem (Kim and Eom, 2021).

Torres et al. (2018) evaluaron la eficacia del tratamiento combinado de los antibióticos ceftazidima y avibactam, en pacientes que presentaban la infección por neumonía nosocomial que está asociada a patógenos Gram negativos, frente al antibiótico meropenem en un ensayo doble ciego. Se eligieron pacientes que presentaban neumonía nosocomial incluida aquella que estaba asociada a la ventilación mecánica, en 136 hospitales de 23 países diferentes y encontraron resultados en términos de eficacia similares para ambos tratamientos (Torres et al., 2018).

Se ha demostrado que el meropenem tiene efectos sinérgicos en combinación con antibióticos aminoglucósidos, esto se determinó mediante el ensayo de tablero de ajedrez y tiempo de muerte. Se obtuvieron 35 aislados de los cuales 19 presentaron resistencia para los antibióticos carbapenémicos imipenem y meropenem con una MIC de 16 a 128 µg/ml. Las características moleculares de estos aislados mostraron la presencia de las carbapenemasas (*bla* NDM-1, *bla* NDM-5 y *bla* OXA-48) así como genes de β-lactamasas de espectro extendido (*bla*CTX-M, *bla*SHV y *bla*TEM). No obstante, en combinación presentaron efectos sinérgicos del meropenem con los aminoglucósidos gentamicina, estreptomicina, kanamicina, tobramicina y amikacina en un 84.2%, 79% y 68.4% respectivamente (Terbtthakun et al., 2021). Desafortunadamente, diversos estudios han demostrado que la resistencia a los carbapenémicos está en aumento, y son catalogados como prioridad crítica de acuerdo con lista que publicó la OMS en el 2017, dejando pocas alternativas para contrarrestar a los MDR (Breijyeh et al., 2020; Chouchani et al., 2011; “La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos,” n.d.; Lin et al., 2021; Papp-Wallace et al., 2011).

Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas de amplio espectro principalmente contra microorganismo Gram negativos, este grupo incluye a la gentamicina, amikacina, tobramicina, neomicina y estreptomicina (Krause et

al., 2016). El primer aminoglucósido aislado fue la estreptomicina obtenida de la bacteria *Streptomyces griseus*, se introdujo en el sector clínico en 1944, posteriormente entre 1949 y 1972 se introdujeron otros antibióticos del mismo grupo tales como: la neomicina, kanamicina, gentamicina, netilmicina, tobramicina y amikacina. Sin embargo, su uso clínico disminuyó en la década de 1980 debido a la introducción de las cefalosporinas, carbapenémicos y fluoroquinolonas de tercera generación que se consideraban menos tóxicos y con mayor aplicación (Krause et al., 2016; Serio et al., 2018).

Estos antibióticos se caracterizan por ser polares y presentan mala absorción gastrointestinal, por lo que es necesaria su administración intravenosa o intramuscular en los pacientes enfermos (Krause et al., 2016). El mecanismo de acción de los aminoglucósidos se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas. Los aminoglucósidos son azúcares hidrófilos con funciones amino e hidroxilo, además son considerados policatiónicos y tienen afinidad de unión con los ácidos nucleicos especialmente con fragmentos de ARN procariótico (Serio et al., 2018, 2017). Estos antibióticos se unen al sitio A que es un sitio de reconocimiento de aminoacil-tRNA en el 16S del rRNA de la subunidad 30S, esta unión provoca la inhibición de la síntesis de polipéptidos y conlleva a la muerte celular (Doi et al., 2016). Los tratamientos con los antibióticos aminoglucósidos tienen alta afinidad por algunos sitios en el rRNA, lo cual permite que se forme una encuadernación que depende de la complejidad estructural de ambos. Específicamente, la gentamicina y la

kanamicina se une al sitio A del rARN 16S en la bacteria *E. coli* y con ello se brinda una protección en las bases A1408 y G1494 de manera muy similar en el sitio A del rRNA. Se sabe que las bases A1408, A1492, A1493 y G1494 en el sitio A del rRNA, son las encargadas de interactuar con el tRNA, al estar unidos los aminoglucósidos al sitio A en la región encargada de reconocer el codón y el anticodón, provoca la interferencia con el reconocimiento del tRNA que tiene afinidad por el rRNA durante la traducción y dan como resultado interacciones codón-anticodón erráticas (Kotra et al., 2000; Moazed and Noller, 1987).

La resistencia que presentan los microorganismos a los aminoglucósidos, se debe principalmente a mutaciones y alteraciones enzimáticas en la diana del ribosoma, lo que provoca la salida del antibiótico fuera de la célula o la modificación del mismo alterando su función (Serio et al., 2017). Se sabe que la modificación de la diana a través de mutaciones es uno de los principales mecanismos de RAM para muchos antibióticos. Sin embargo, para el caso de los aminoglucósidos es poco probable que se dé por mutaciones en los genes relacionados a los componentes estructurales del ribosoma, debido a que la mayoría de los microorganismos presentan múltiples copias de los genes que codifican el rRNA por lo que la probabilidad de que las múltiples copias adquieran la mutación requerida para generar resistencia es poco probable (Serio et al., 2017). Se ha reportado el caso de los géneros de microorganismos *Mycobacterium* y *Borrelia* los cuales tienen

una sola copia de estos genes, por lo que la RAM a los aminoglucósidos provocada por mutaciones ribosómicas, es relevante para estos microorganismos (Bercovier et al., 1986; Schwartz et al., 1992; Serio et al., 2018). En el caso de la bacteria *M. tuberculosis* se ha reportado que los genes que confieren resistencia a la estreptomicina, se debe a mutaciones que codifican los componentes del rARN 16S y a la proteína S12 especialmente el gen *rpsL*, lo que afecta la unión de la estreptomicina al verse alterada el rRNA 16S (Prammananan et al., 1998; Serio et al., 2017). Existen dos mecanismos principales que confieren resistencia de estos antibióticos a microorganismos de interés clínico; las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos (AME) y las enzimas metiltransferasa ribosómicas RMTasas (Böttger and Crich, 2020). Las enzimas AME son modificadoras que sustituyen los grupos hidroxilo o amino específicos en el compuesto y se encuentran tres familias diferentes; la familia aminoglucósido acetiltransferasas (AAC), las enzimas aminoglucósido fosfotransferasas (APH) y la aminoglucósido nucleotidil transferasas (ANT). Para el caso de las RMTasas que modifican la unión del antibiótico mediante la metilación, específicamente en el sitio N7 de la base G1405, se han reportado diversas enzimas que presentan la misma modificación sobre todo en especies Gram negativas tales como: RmtA, RmtB, RmtG, RmtH, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, y ArmA, respectivamente (Böttger and Crich, 2020). En el caso de la bacteria *E. coli*, se ha identificado la enzima NpmA, (RMTasa), esta enzima confiere resistencia de amplio espectro para los aminoglucósidos

neomicina y apramicina, gentamicina, tobramicina y amikacina por lo que es una enzima de gran importancia en la multirresistencia de esta bacteria (Doi et al., 2016).

Los aminoglucósidos suelen utilizarse contra infecciones provocadas por los MRD resistentes a los carbapenémicos como la tigeciclina, la gentamicina y la colistina, siendo la tigeciclina la que ha demostrado mayor actividad contra los MRD, ya que tiene una alta afinidad a hacia los ribosomas bacterianos y el antibiótico no se ve afectado por los mecanismos comunes de resistencia que tienen las bacterias hacia las tetraciclinas (Ni et al., 2016). No obstante, diversos estudios demostraron variación en la respuesta que presentaron los microorganismos con el uso de la tigeciclina ya que se ha requerido de dosis altas, así como el uso de terapias combinadas con los carbapenémicos para el tratamiento de las infecciones por MRD. Sin embargo, no está claro si la terapia combinada o el uso de dosis más altas es más efectivo para contrarrestar el problema de RAM y la MRD, aunque se demostró que esta combinación potencia la respuesta de los carbapenémicos (Bedenić et al., 2018; Cayci et al., 2021; Li et al., 2021; Ni et al., 2016). Sin embargo, ya se han reportado diversos genes que confieren resistencia a la tigeciclina, se encontró la presencia de mutaciones en los genes *TetA*, *TetM* y *TetX* que pueden causar resistencia a este antibiótico en la bacteria *E. coli*, y se predice que el gen *TetX* es un gen de relevancia para la resistencia a la tigeciclina en MDR. Por otro lado se han relacionado las mutaciones del gen *TetA*, en la

diseminación de la RAM en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Chiu et al., 2017; Du et al., 2018).

La gentamicina se caracteriza por ser eficaz contra bacterias resistentes a diversos antibióticos, debido a su efecto bactericida contra bacterias Gram negativas y positivas, suele distribuirse sin cambios en el espacio extracelular antes de su excreción vía renal. Sin embargo, su uso suele estar limitado por los efectos adversos graves que se desencadenan en ototoxicidad y nefrotoxicidad en los humanos, a pesar de ello, la gentamicina ha tomado gran relevancia para las terapias combinadas, sobre todo con antibióticos carbapenémicos (Hayward et al., 2018; Terbtthakun et al., 2021).

Importancia de la secuenciación genómica en el entendimiento de la evolución de la RAM.

Los avances tecnológicos en las técnicas de secuenciación de alto rendimiento, como la secuenciación del genoma completo (SGC). Han propiciado que se convierta en una de las principales herramientas para entender y mejorar la problemática que presenta la RAM (Köser et al., 2014;

Van Camp et al., 2020). Es por ello que en la actualidad los usos y aplicaciones que se le pueden atribuir, abarcan diferentes áreas, las cuales han fomentado el desarrollo de nuevos antibióticos, pruebas diagnósticas, así como la elucidación de los factores que contribuyen en la aparición de la RAM en microorganismos de interés clínico (Köser et al., 2014; Van Camp et al., 2020). Por otro lado, también se han utilizado para estudiar la evolución de la resistencia en diferentes condiciones y esto ha permitido obtener avances en la comprensión de esta problemática (Palmer and Kishony, 2013).

Un estudio realizado con cepas de *M. tuberculosis*, en donde se secuenció genoma completo y caracterizó bioquímicamente a las bacterias que presentaban diferencias en la aparición de la RAM, al antibiótico etambutol en diferentes concentraciones, determinó la aparición de mutaciones en los genes *Rv3806c*, *Rv3792*, *embB* y *embC*, así como la presencia de un nuevo mecanismo asociado a una mutación sinónima en el gen *Rv3792*, también se pudo observar que la resistencia para este antibiótico surge a partir de un proceso gradual que se determina por las diferentes concentraciones a las cuales la bacteria está expuesta (Safi et al., 2013). Por otro lado, la identificación de los mecanismos de resistencia mediante la SGC, tiene importantes aportaciones en el diseño de ensayos clínicos, ya que la determinación de la RAM con base en la MIC, suelen dar como resultado concentraciones mínimas a comparación de las MIC que presentan las cepas bacterianas tipo silvestres, por lo que se ha mejorado la dosificación en los

tratamientos para intentar disminuir este fenómeno (Müller et al., 2013). Otra aportación de la SGC, es el descubrimiento de la resistencia cruzada que influye en la elección de los antibióticos que se incluyen para el tratamiento de la RAM y la MDR (Müller et al., 2013). No obstante, la SGC también puede aportar información en un contexto evolutivo que se apoya con el descubrimiento de los genes involucrados en la adaptación a determinados antibióticos (Baym et al., 2016).

A pesar de los grandes avances que se han logrado en la mejora de esta tecnología en términos de costo y procesamiento de muestras, es necesario el desarrollo de plataformas adecuadas que utilicen técnicas estructurales y de análisis, que contenga grandes bases de datos biológicos obtenidos mediante SGC, para la determinación de nuevas predicciones o nuevas aportaciones en el área de la biología, específicamente para poder comprender y aplicar toda la información que el uso de esta tecnología nos está brindando, en el desarrollo y propagación de la RAM (Hendriksen et al., 2019; Saeb et al., 2017). Como en el caso de aquellas relacionadas con la identificación de ARGs en cepas de interés clínico (Papp and Solymosi, 2022).

CAPÍTULO 3

3. Aportación científica, hipótesis y objetivos

Aportación científica

El desarrollo y la propagación de la resistencia a los antibióticos en las comunidades bacterianas, representa un excelente modelo para probar el potencial de los principios evolutivos, genotípicos y fenotípicos en escalas de tiempo cortas. La mayoría de los estudios que se han realizado sobre todo en terapias combinadas, dejan afuera la parte evolutiva que conlleva a la adquisición de la RAM y la MDR por ello, la capacidad de entender su aparición está incompleta, al menos que se integre el conocimiento de las fuerzas evolutivas que actúan sobre los procesos de diversificación genética y adaptación, para poder proponer terapias más eficientes y contrarrestar la aparición de patógenos de interés clínico a nivel mundial, sobre todo en los trabajos realizados con las terapias combinadas debido a la eficacia que han demostrado para combatir a los microorganismos patógenos resistentes y multirresistentes.

Hipótesis

La metodología de la placa MEGA-plate permitirá identificar y caracterizar las trayectorias genéticas y fenotípicas de los mecanismos

evolutivos que la bacteria *E. coli* desarrolla para resistir a los antibióticos meropenem y gentamicina, tanto en combinación como por separado.

Objetivo

Elucidar la trayectoria genética y fenotípica de los mecanismos evolutivos que generan la resistencia en la bacteria *E. coli* a los antibióticos meropenem y gentamicina, tanto en combinación como separados.

Objetivos particulares

1. Diseñar y estandarizar la placa MEGA-plate para determinar la adaptación de *E. coli* a los antibióticos meropenem y gentamicina por separado y en combinación.
2. Secuenciación de las colonias de *E. coli* obtenidas de la MEGA-plate con los antibióticos meropenem y gentamicina.
3. Evaluar la trayectoria genética de la bacteria *E. coli* en la placa MEGA-plate con los antibióticos meropenem y gentamicina.
4. Comparar los mecanismos de resistencia desarrollados por la bacteria *E. coli* con otros mecanismos reportados en la literatura, dentro de un contexto evolutivo.

CAPÍTULO 4

4. Materiales y métodos

Cepa y condiciones microbianas (overnight)

La cepa bacteriana utilizada fue *E. coli* ATCC (# de catálogo 11229) cultivada en medio Luria-Bertani (LB; Difco). Para realizar el overnight, se cultivó 5 ml de medio de cultivo LB con 200 µl de la bacteria *E. coli* (37°C a 150 rpm) durante toda la noche, posteriormente se realizó un resembrado en las mismas condiciones hasta que la bacteria alcanzó una densidad óptica (DO) de 0.2 ± 0.02 para su posterior uso.

Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (MIC)

Las MIC's se desarrollaron con base en la metodología de Garza-Cervantes et al. (2020). En placas de 96 pozos Costar (Corning). El stock de antibióticos meropenem y gentamicina (Laboratorios Química SON'S. Puebla, México y laboratorio AMSA, México), se preparó siguiendo las recomendaciones del proveedor. De estas soluciones, se agregó el volumen necesario para lograr las concentraciones de 1 µg/ml del antibiótico meropenem y 32 µg/ml del antibiótico gentamicina respectivamente, dentro de un volumen final de 200 µL. A continuación, se realizaron diluciones en serie tomando 100 µL de cada pocillo siguiente con 100 µL de medio de cultivo y

desechando los últimos 100 µL. Así, las concentraciones probadas fueron de 1 a 0.0625 ppm para el antibiótico meropenem y de 16 a 0.5 ppm de gentamicina.

Para inocular con la bacteria cada pocillo de la placa con tratamiento, se utilizó un cultivo de una noche (Overnight, cultivo de 20 h incubado a 37 °C-150 rpm) de la cepa (*E. coli* ATCC 11229) y se incubó hasta alcanzar una densidad óptica crítica a 600 nm (DO 600) de 0.2 ± 0.02 ; ajustándolo con medio fresco si era necesario para alcanzar la concentración celular necesaria. Se alcanzó un rango de concentración de 10^{-7} - 10^{-8} células/ml, respaldado por observaciones de recuento de placas medidas por el método de dilución en serie determinadas por Garza-Cervantes et al. (2020). A partir de esto, se hizo una dilución 1:100 con medio fresco en un tubo de 15 ml, y luego se agregaron 100 µL de esta dilución a cada pozo de prueba para lograr una concentración final de 10^{-5} células/ml, posteriormente se incubaron a 37°C-150 rpm. Después de 24 h de incubación en estas condiciones, se midieron las densidades ópticas (OD) de los inóculos de control y tratados. La determinación de MIC fue el valor en el que no se observó un crecimiento significativo (OD 600 < 0.05). Todas las pruebas y sus respectivas muestras de control se realizaron en réplicas de tres

Determinación de la MIC para tratamientos combinatorios de los antibióticos gentamicina y meropenem

El ensayo de tablero de ajedrez (Montelongo-Peralta et al., 2019), se realizó en placas de 96 pozos Costar (Corning). El stock de antibióticos meropenem y gentamicina (Laboratorios Química SON'S. Puebla, México y laboratorio AMSA, México), se preparó siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las fracciones de la MIC (0, 0,5, 0,25 y 0,125) del antibiótico gentamicina se colocaron en el eje horizontal y las fracciones (0, 0,5, 0,25 y 0,125) del antibiótico meropenem se colocaron en el eje vertical de la placa. Las concentraciones de ambos antibióticos fueron de 8x respecto a la MIC obtenidas por separado (8 y 0.125 µg/ml).

Para el cultivo de la bacteria *E. coli* ATCC (# de catálogo 11229) se realizó la técnica de overnight descrita anteriormente. Las fracciones de MIC de 0.5, 0.25 y 0.125 de cada antibiótico se combinaron para lograr un volumen final de 200 µL incluido el inóculo bacteriano. Se realizó dilución de las combinaciones (2 veces) transfiriendo 100 µL a la dilución siguiente, se descartó los últimos 100 µL de la línea 3. La placa se incubó 37 °C durante 24 horas. Se midió la densidad óptica (DO) del control y de los inóculos tratados para poder determinar la MIC combinatoria. Todas las pruebas y sus respectivas muestras de control se realizaron en réplicas de tres.

Diseño de la placa de acrílico MEGA-plate de 40 x 54 cm

El diseño de la MEGA-plate se realizó con el software AutoCAD 2023 (<https://www.autodesk.com/>) bajo la licencia estudiantil, siguiendo la metodología establecida por Baym et al. (2016) con algunas modificaciones (ver figura 1).

- Para la base y la tapa se requiere una lámina de acrílico de 44 cm x 60 cm x 0.6 cm.
- Para las paredes de la placa, se requiere de 2 tiras de 40 cm x 5 cm x 0.6 cm y 2 tiras de 58 cm x 5 cm x 0.6 cm
- Para las 5 separaciones intermedias, se requiere de 4 tiras de 40 cm x 2.5 cm x 0.6 cm. La separación de las 5 bandas tendrá un ancho de 10 cm que se extenderán a lo largo de la placa.

La placa se pegó con diclorometano y se selló con adhesivo de silicona para evitar derrames.

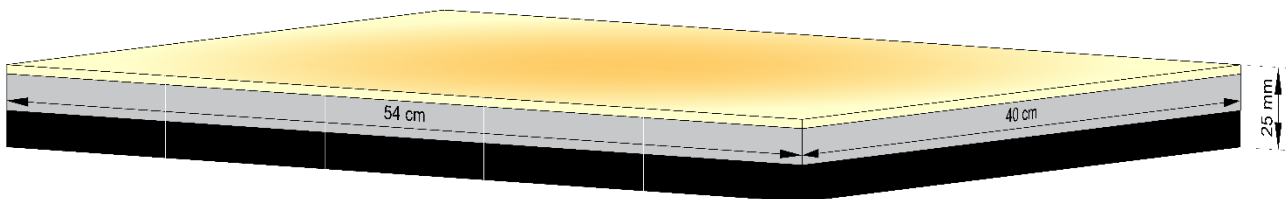


Figura 1. Diseño de la placa Mega-plate con el software AutoCAD (versión 2023).

Estandarización

Para las pruebas de estandarización de los medios de cultivo y la temperatura, se corrió una prueba piloto en un recipiente de plástico de 15x 27 cm de largo, y se realizó la misma metodología que se describe a continuación ajustando los volúmenes necesarios para el recipiente de plástico.

Esterilización de la placa MEGA-plate y medios de cultivo

Antes del vaciado de los medios, la placa se desinfectó con hipoclorito diluido (5-10%) durante toda la noche. Se utilizaron 6 litros de medio LB con doble ciclo de esterilización para reducir el riesgo de contaminación y fueron distribuidos en la placa en 3 capas (capa base, intermedia y superficial) con diferentes porcentajes de agar bacteriológico (BD Bioxon). Para la base se utilizó 2 litros del medio LB con agar bacteriológico al 2 % y se le agregó el antibiótico Kanamicina (Sigma-Aldrich) (30µg/ml) cuando el medio ya estuvo atemperado. En el caso de la capa intermedia, se agregó 2 litro de LB con agar al 2% sin antibiótico. A la capa base e intermedia, se le agregó 4 ml de tinta china (Stafford Azor) antes de la esterilización del medio con la finalidad de crear un contraste y poder observar el crecimiento bacteriano. Posteriormente, para la capa superficial se utilizó 2 litros de medio LB con agar al 0.28% para crear un medio semisólido, y se le agregó el antibiótico a desafiar de acuerdo con la MIC establecida para la cepa de *E. coli* ATCC (# de catálogo 11229).

Inoculación de la bacteria *E. coli*

Se inoculó 300 µl la bacteria *E. coli* previamente activada en una de las bandas de los extremos, y se incubó a 37°C durante un periodo de 9 a 22 días.

Selección de fenotipos resistente

Se tomaron muestra de 6 puntos de las colonias resistentes de cada carril de la capa superior y se resembraron en placas de medio LB con agar bacteriológico y LB líquido, que contenían las mismas concentraciones de antibiótico de las cuales fueron aisladas (0, 0.125, 1.25, 12.5 y 125 µg/ml) para el antibiótico meropenem y para el antibiótico gentamicina de (0, 4, 40, 400 y 4,000 µg/ml), en las muestras de gentamicina que corresponden a la concentración más alta se tomó un total de 10 muestras. En el caso del cultivo líquido, las muestras se inocularon en un tubo falcón de 15 ml con 10 ml de medio LB a la concentración de antibiótico correspondiente a cada carril por triplicado a 37°-150 rpm hasta observar crecimiento, y las muestras de cultivo sólido se incubaron a 37°C respectivamente. Para el caso de las muestras sólidas de la placa combinatoria se tomaron entre 8 y 16 muestras de cada carril y se resembraron a las concentraciones correspondientes.

Tinción de Gram

Se realizó el procedimiento de la tinción de Gram para observar los fenotipos de las bacterias evolucionadas (Tripathi and Sapra, 2024). Con un asa bacteriológica, se tomó muestra de las bacterias obtenidas de la MEGA-plate. La muestra se extendió en un portaobjetos con una gota de agua destilada estéril colocado previamente y se dejó secar. Una vez que secó se fijó con fuego durante unos segundos y se procedió con la tinción con los siguientes pasos:

- Se agregó el colorante primario cristal violeta durante 1 minuto posteriormente se lavó con agua corriente.
- Se agregó Lugol durante 1 minuto, después se realizó el lavado
- Se agregó alcohol a 96% durante 15 segundos
- Se agregó el colorante secundario safranina durante 1 minuto.
- Se dejaron secar y se observaron en el microscopio.

Extracción y secuenciación del ADN

Para la extracción de ADN, utilizamos el kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (50 preparaciones, Invitrogen) para obtener ADN genómico de ocho aislados resistentes al antibiótico meropenem y 10 aislados resistentes al antibiótico gentamicina. Las muestras de ADN extraídas se enviaron a la empresa Secoya Labs en el Parque de Investigación e Innovación Tecnológica

(PIIT) en Nuevo León, México para la secuenciación por el método de nanoporos, de acuerdo con el protocolo descrito por Wang et al. (2021). Secoya Labs se especializa en secuenciación de ADN de alta calidad y cuenta con instalaciones de última generación que utilizan la tecnología más avanzada para garantizar resultados precisos y eficientes. La calidad de las muestras de ADN secuenciadas se evaluó en función de los puntajes de calidad y la precisión de las lecturas. Para asegurar la precisión de los datos de secuenciación, es importante evaluar cuidadosamente la calidad de las muestras de ADN antes de proceder con análisis adicionales.

Procesamiento de las secuencias y análisis bioinformáticos

Se realizó el análisis de puntuación de calidad Phred y puntuaciones de calidad y precisión de lectura ("Quality Scores And Read Accuracy," 2021) de 8 genomas completos para el antibiótico meropenem y 10 genomas completos para el antibiótico gentamicina. El formato fasta de los 18 genomas fueron sometidos a evaluación en la base de datos The Comprehensive Antibiotic Resistance Database CARD, 2024 (<https://card.mcmaster.ca/>) (McArthur et al., 2013). Se realizó un análisis exhaustivo para detectar la presencia de los genes de resistencia (ARGs). Los criterios de seleccionados fueron en términos estrictos y perfectos. Se cargaron los archivos por separados en la plataforma RGI (Resistance Gene Identifier), para poder tener la interacción entre las diferentes muestras de los genomas de *E. coli*. Se construyó un

mapa de calor y una red de asociación utilizando el programa R Core Team (2024) ("R: The R Project for Statistical Computing," n.d.). Los genes de resistencia que se obtuvieron fueron analizados en el programa Cytoscape 3.10.2 (Otasek et al., 2019) y se utilizó la aplicaciones ClueGo (Bindea et al., 2009) para determinar las funciones biológicas a las cuales, los ARGs estaban relacionados.

Determinación de las matrices de presencia y ausencia de los ARGs del desafío con meropenem y gentamicina

El índice de similitud de Jaccard (Jaccard, 1901) se utilizó para evaluar la similitud por pares de la presencia o ausencia de genes en diferentes carriles, correspondientes a diversas concentraciones del antibiótico gentamicina. En este índice, la proporción de la intersección a la unión de genes entre dos condiciones cualesquiera cuantifica la proporción de genes compartidos en relación con el número total de genes observados en los carriles. El índice de Jaccard se calculó para cada par de carriles que representan concentraciones distintas de gentamicina para determinar la superposición en la presencia de genes. Un valor de 1 indicaba que los mismos genes estaban presentes en ambas condiciones, mientras que 0 denotaba que no había genes compartidos entre las dos concentraciones. Este análisis nos permitió comparar los perfiles genéticos en diferentes tratamientos con gentamicina y visualizar el grado de similitud o divergencia en los patrones de presencia de genes. Los resultados

se presentan como una matriz de similitud, una herramienta integral que identifica posibles grupos de genes que responden de manera similar a los antibióticos. El cálculo del índice de Jaccard se realizó para todas las combinaciones posibles por pares de concentraciones de gentamicina, resultando en una matriz de similitud integral. Esta matriz proporciona información sobre los efectos dependientes de la dosis de gentamicina en los patrones de ausencia/presencia de genes.

Además, se aplicó un agrupamiento jerárquico a la matriz de similitud para identificar concentraciones grupales con perfiles genéticos similares, revelando potencialmente efectos umbral o respuestas no lineales a los antibióticos. La matriz de similitud generó una matriz de adyacencia con un valor umbral de 0.65. Los valores por debajo del umbral se establecieron en 0, mientras que los valores por encima del umbral se establecieron en 1. Este proceso produce una matriz binaria que facilita la representación de datos como una red. En esta red, cada nodo correspondía a un carril (indicando una concentración específica de gentamicina), y la conexión entre nodos indicaba una similitud en los perfiles de presencia de genes que superaba el umbral. Esta estructura de red permite una comparación cuantitativa de la similitud genética entre condiciones y proporciona una representación visualmente atractiva, destacando así grupos de carriles con perfiles genéticos compartidos. Este enfoque basado en redes permitió la identificación de patrones y relaciones clave dentro de los datos de presencia de genes en

diferentes concentraciones de gentamicina. Al visualizar los datos, podemos detectar tendencias, valores atípicos y posibles efectos dependientes de la dosis en la expresión génica. Además, este método de representación de datos puede ser particularmente útil para identificar grupos de genes que se comportan de manera similar bajo diferentes concentraciones de antibióticos, revelando potencialmente información sobre los mecanismos regulatorios compartidos o las relaciones funcionales.

En nuestro análisis del conjunto de datos de meropenem, empleamos un enfoque similar para construir una red. Inicialmente, utilizamos el índice de similitud de Jaccard (Jaccard, 1901) para evaluar la similitud de pares de genes en varias concentraciones de meropenem. Similar al análisis de gentamicina, primero generamos una matriz de similitud y luego aplicamos un valor umbral para convertirla en una matriz de adyacencia binaria. Para este análisis, utilizamos un valor umbral consistente de 0.65 para transformar las puntuaciones de similitud en datos binarios, estableciendo las puntuaciones por debajo del umbral en 0 y por encima del umbral en 1.

El análisis involucró la visualización, comparación e interpretación de la presencia o ausencia de genes en diferentes antibióticos como gentamicina, meropenem y florfenicol. Se creó un mapa de calor utilizando genes codificados por colores (azul para ausencia y rojo para presencia) para representar visualmente la presencia de genes en los antibióticos.

Posteriormente, se generó un mapa de calor más detallado utilizando la biblioteca pheatmap para agrupar tanto las filas (genes) como las columnas (antibióticos) y observar patrones de similitud genética en los tratamientos (“pheatmap function in R,” 2021). Luego se utilizó un gráfico de barras para ilustrar el número total de genes presentes para cada antibiótico, seguido de un gráfico de barras apiladas para representar la proporción de genes presentes o ausentes para cada antibiótico. Se aplicaron escalas de colores personalizadas para diferenciar entre presencia y ausencia en los mapas de calor y gráficos de barras.

Por último, se generó un mapa de calor integral con nombres de filas (muestras de genes), agrupando filas y columnas para dilucidar patrones de presencia y ausencia de genes (“El paquete ggplot2,” n.d.). Esta visualización fue crucial para proporcionar información sobre qué antibióticos exhiben perfiles genéticos similares, observando las relaciones entre la presencia de genes y los tratamientos con antibióticos.

CAPÍTULO 5

5. Resultados

Estandarización de placa MEGA-plate

Se logró la determinación de la de las características del vaciado del medio LB y los tiempos de secado para lograr la formación de las 3 capas necesarias, así como el contraste de color negro con el uso de la tinta china y la determinación de los diferentes linajes que se suelen dar en estas condiciones, similares a las obtenidas por Baym et al. (2016), en refractarios de 15x27 cm (ver figura 2).

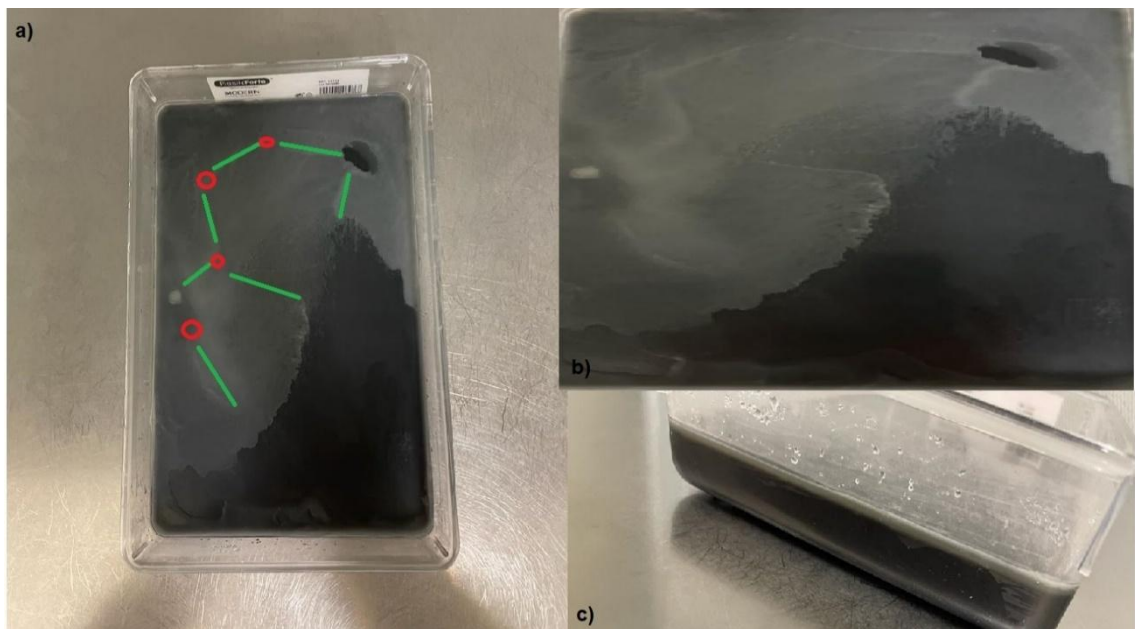


Figura 2. En a) y b) se puede observar los linajes que formaron de la bacteria *E. coli*, al ir creciendo en el medio LB, c) estratificación de las 3 capas de medio en el refractario.

MIC de los antibióticos meropenem y gentamicina

Se determinó la MIC del antibiótico meropenem en 0.125 µg/ml y para la gentamicina en 4 µg/ml. En el caso de la MIC combinatoria, se estableció una concentración de 0.015625 µg/ml para el meropenem y de 1 µg/ml para la gentamicina. El incremento en la concentración de cada carril fue en 10x respecto a la MIC establecida.

Crecimiento de la MEGA-plate para el antibiótico meropenem

La placa que corresponde al antibiótico meropenem se dejó por un periodo de 9 días en incubación a 37°C, hasta que creciera al carril con mayor concentración del antibiótico (125 µg/ml). No se logró obtener evidencia fotográfica de los linajes en los diferentes carriles en escala de tiempo, debido al sellado y a la condensación que se forma en la superficie, únicamente se obtuvieron fotografías al término del crecimiento en el último carril cuando se destapó para la colectar las muestras (ver figura 3).

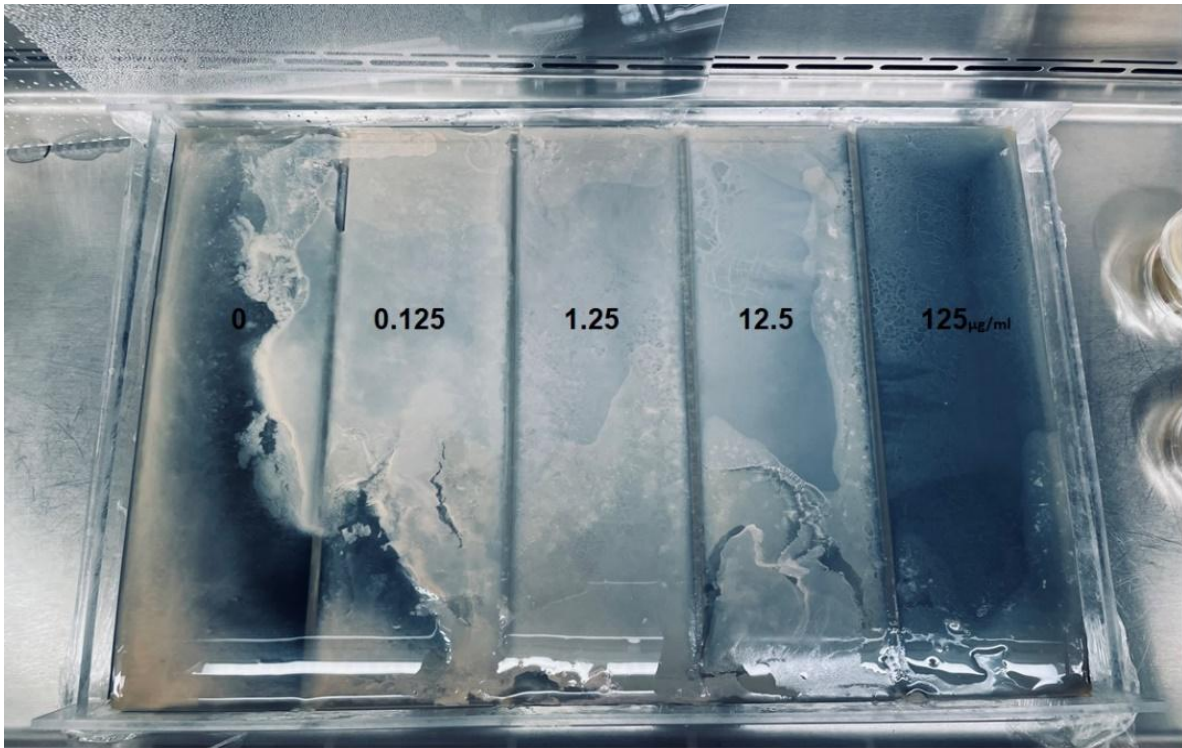


Figura 3. Placa de meropenem con las diferentes concentraciones del antibiótico meropenem.

Colecta de cepas evolucionadas

Se colectaron 6 muestras al azar a lo largo de cada carril, como se puede observar en la figura 4. Esto con la finalidad de obtener diferentes cepas evolucionadas, abarcando la mayor parte del carril muestreado.



Figura 4. Placa de meropenem con los puntos de muestra marcados que se tomaron.

Las muestras colectadas se inocularon en medio LB sólido y líquido con las respectivas concentraciones del antibiótico. Se logró obtener 6 muestras de los carriles 1 al 4 (0, 0.125, 1.25, 12.5µg/ml). Para el carril 5 (125 µg/ml) únicamente se logró el crecimiento de 4 cepas (ver figura 5).

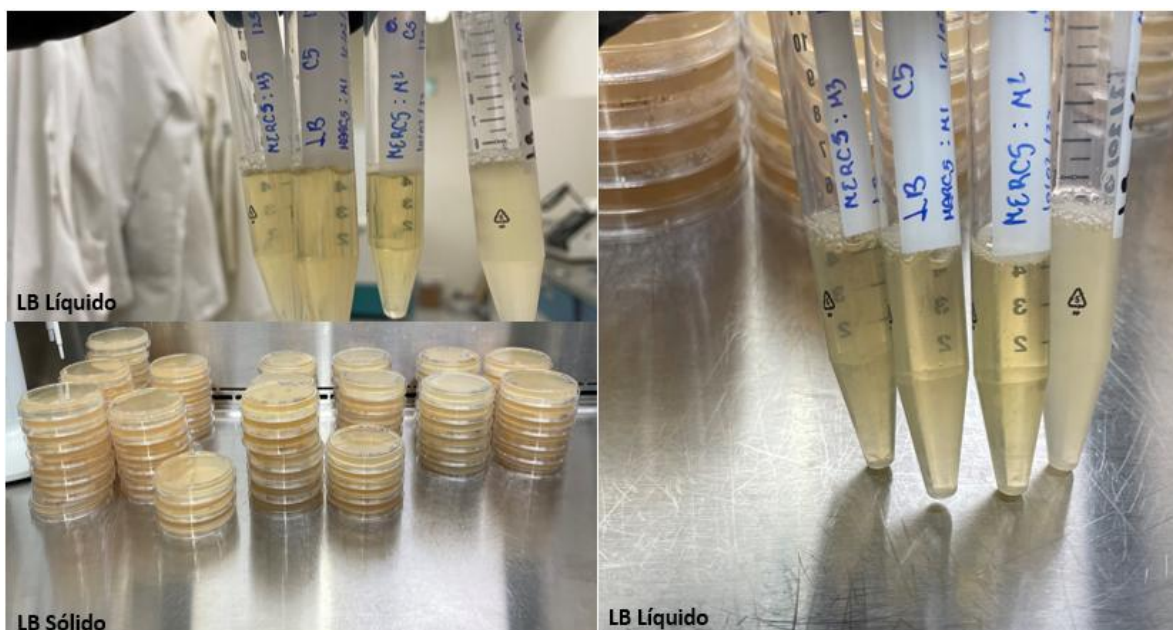


Figura 5. Crecimiento de la bacteria *E. coli* en medio LB líquido y sólido a las diferentes concentraciones que se probaron.

Fenotipo de las cepas resistentes al antibiótico meropenem

Las cepas mostraron diferencias en el fenotipo y en los tiempos de crecimiento en placa, que va de crecimiento rápido a crecimiento lento, con la coloración y consistencia típica de la bacteria *E. coli*. Sin embargo, para las concentraciones más altas (12.5 y 125 $\mu\text{g/ml}$) se dejaron incubando por un periodo de 2 a 4 días y presentaron la característica de ser colonias pequeñas y escasas a lo largo de la placa de Petri (ver figuras 6, 7 y 8).

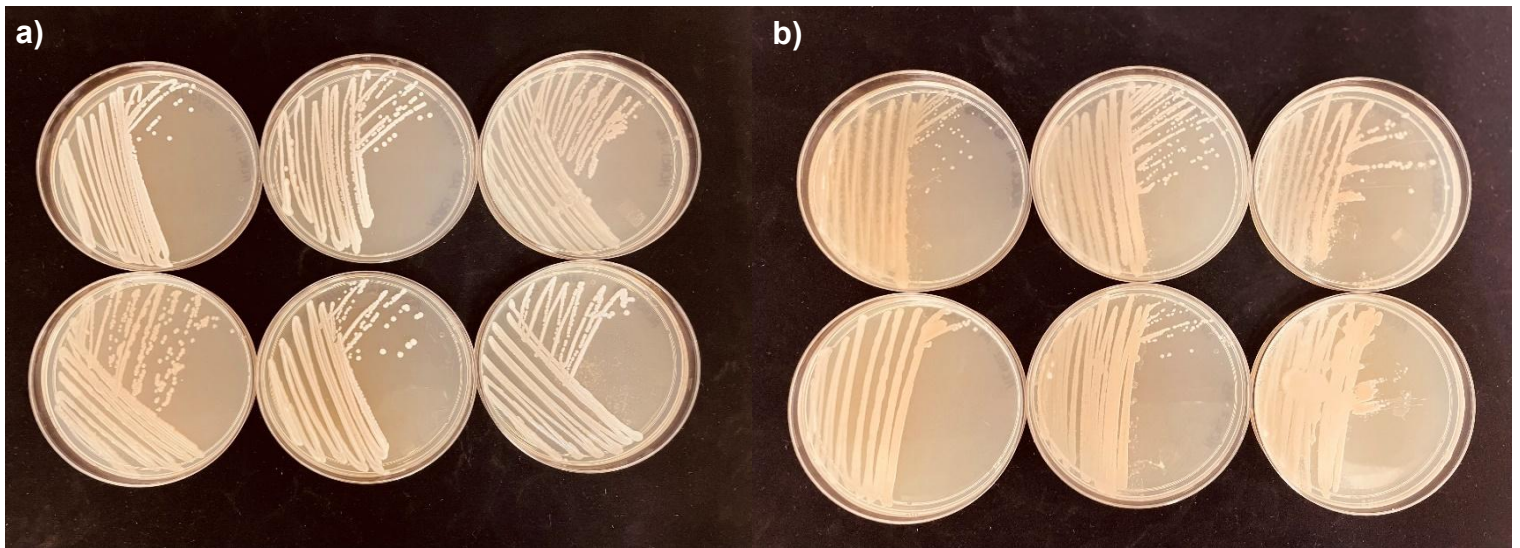


Figura 6. a) Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 1 sin antibiótico, b) crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 2 con 0.125 µg/ml del antibiótico meropenem.

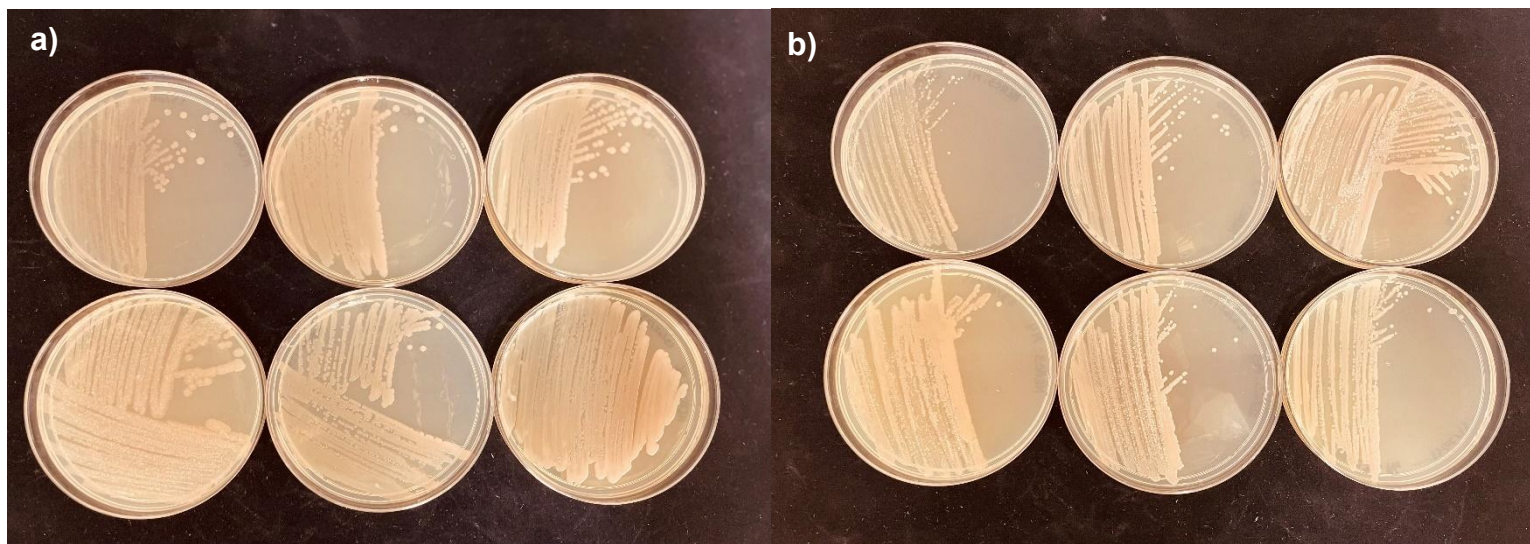


Figura 7. a) Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 3 con 1.25 µg/ml del antibiótico, b) crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 4 con 12.5 µg/ml del antibiótico meropenem.

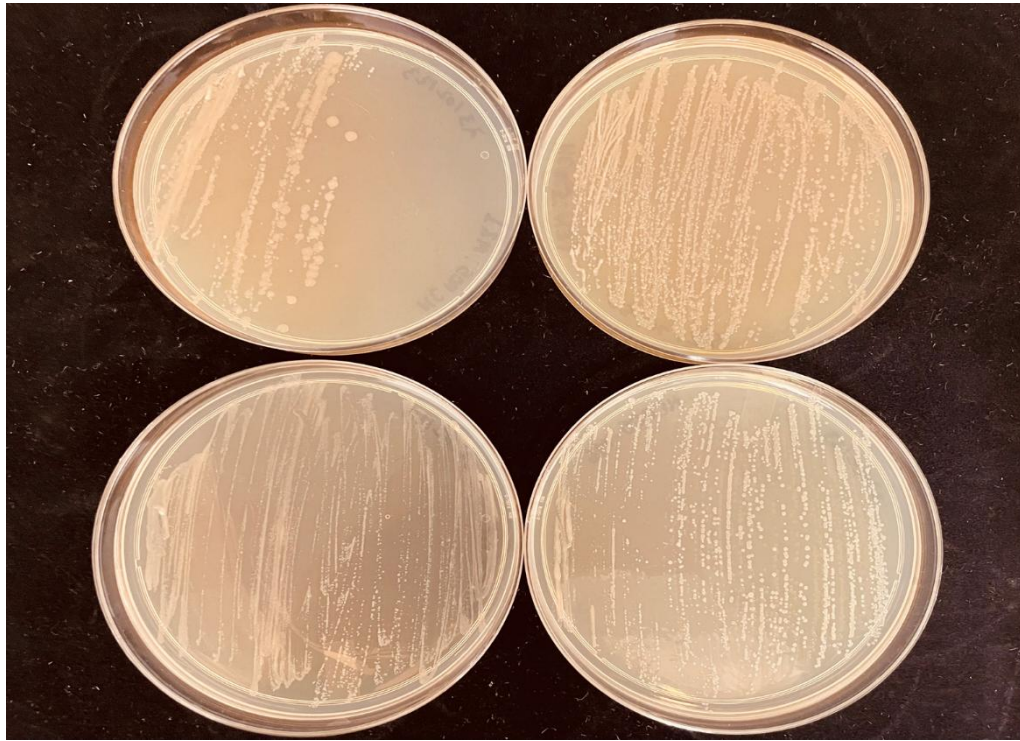


Figura 8. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 5 con 125 µg/ml del antibiótico meropenem.

Los resultados de la morfología observada mediante la tinción de Gram, mostraron morfologías atípicas en comparación con la morfología de bastón que presenta la bacteria *E. coli* en condiciones normales. En las muestras M1 se encontró la morfología de bastón, no obstante, en muestras tomadas pegadas al carril 2 empezó a mostrar morfología de bastón alargado. En el caso de las muestras M2, encontramos morfología de bastón alargada y filamentosa, mientras que las cepas que corresponden al carril M3 perdieron la morfología filamentosa y presentaron morfología ovalada de menor tamaño que en las muestras M2. Las muestras que corresponden al carril M4 también

presentaron cambios en la morfología con menor tamaño que las muestras M3 y tendiendo a una morfología circular. La morfología circular la presentaron las cepas del último carril que tenía la mayor concentración de antibiótico (125 µg/ml) (ver figuras 9-11).

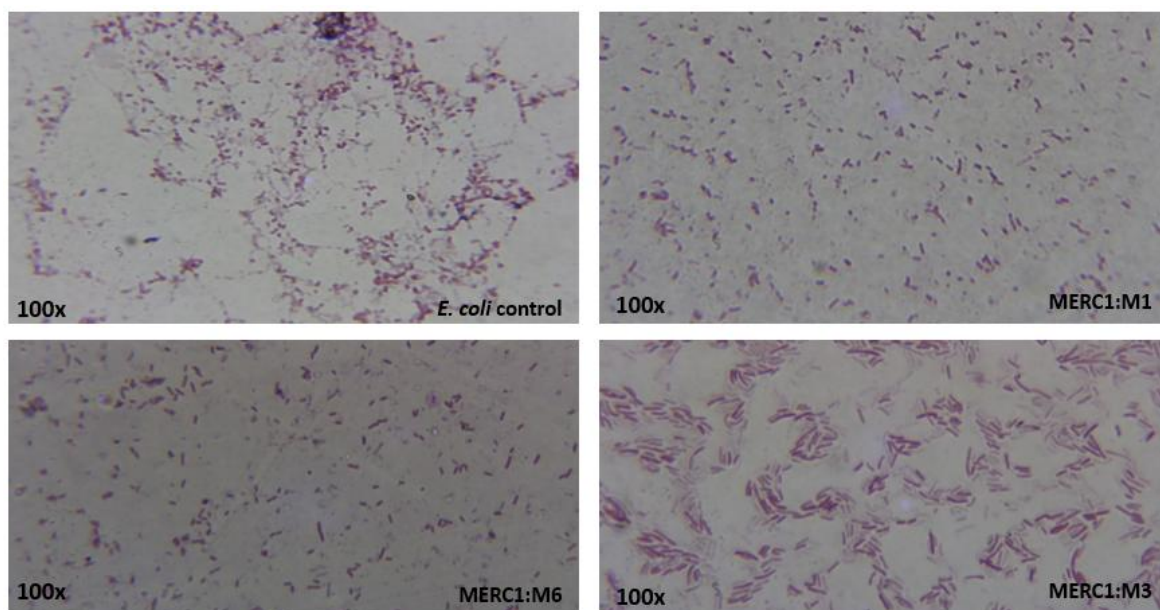


Figura 9. Tinción de Gram de las muestras obtenidas del carril 1 sin antibiótico y *E. coli* control. MER=meropenem, C1 corresponde al carril 1 sin antibiótico M= N° de muestra del mismo carril.

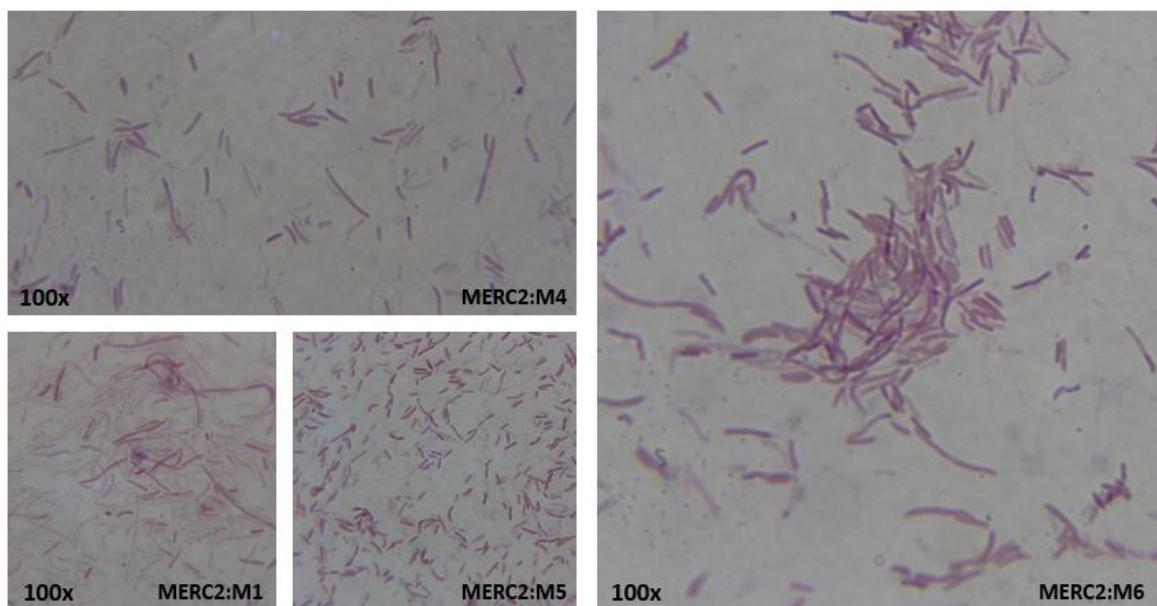


Figura 10. Tinción de Gram de las muestras obtenidas del carril 2. MER=meropenem, C2 corresponde al carril 2 y M= N° de muestra del mismo carril.

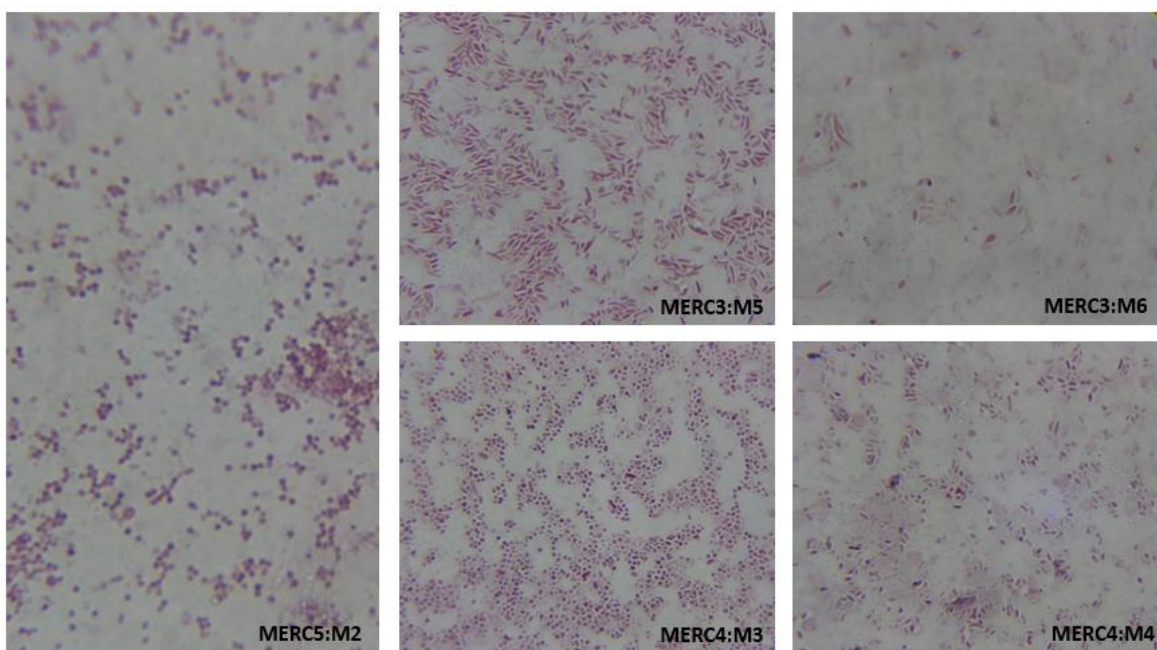


Figura 11. Tinción de Gram de las muestras obtenidas de los carriles 3, 4 y 5. MER=meropenem, C3, C4 y C5 corresponden a los carriles 3, 4 y 5, M= N° de muestra del mismo carril.

Crecimiento de la MEGA-plate para el antibiótico gentamicina

La placa que corresponde al antibiótico gentamicina se dejó crecer por un periodo de 13 días en incubación a 37°C, hasta que creciera al carril con mayor concentración del antibiótico (4,000 µg/ml). No se logró obtener evidencia fotográfica de los linajes en los diferentes carriles en escala de tiempo, debido al sellado y a la condensación que se forma en la superficie, únicamente se obtuvieron fotografías al término del crecimiento en el último carril cuando se destapó para la colectar las muestras (ver figura 12 y 13).

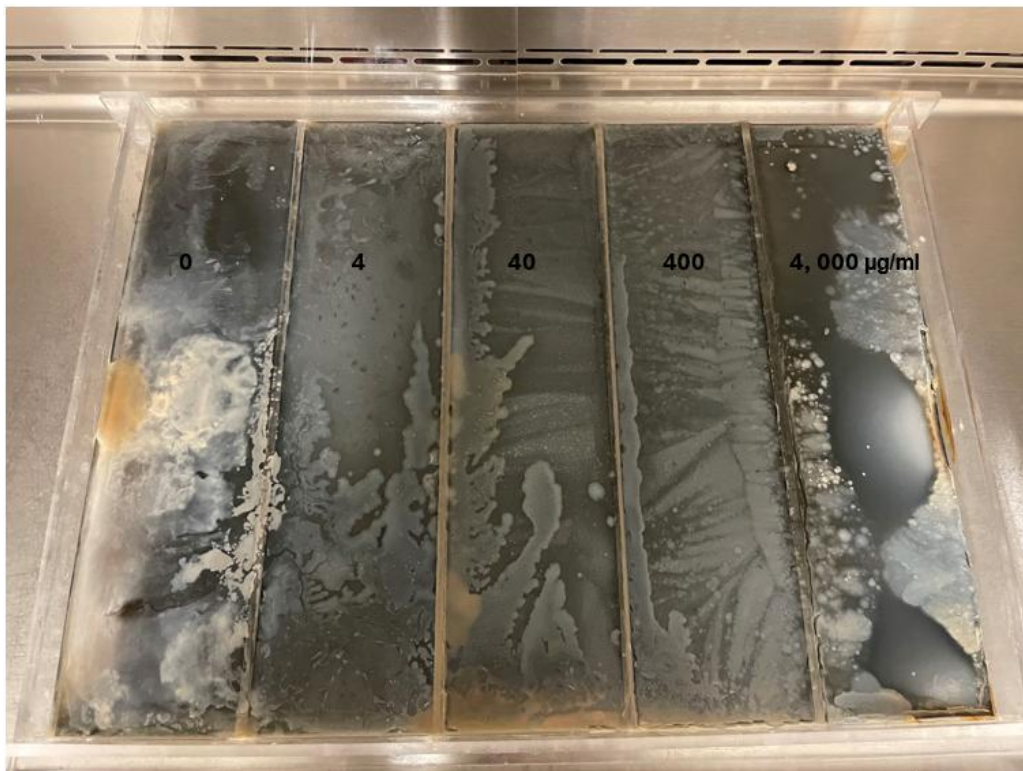


Figura 12. Crecimiento de la bacteria *E. coli* después de 13 días de exposición al antibiótico gentamicina.

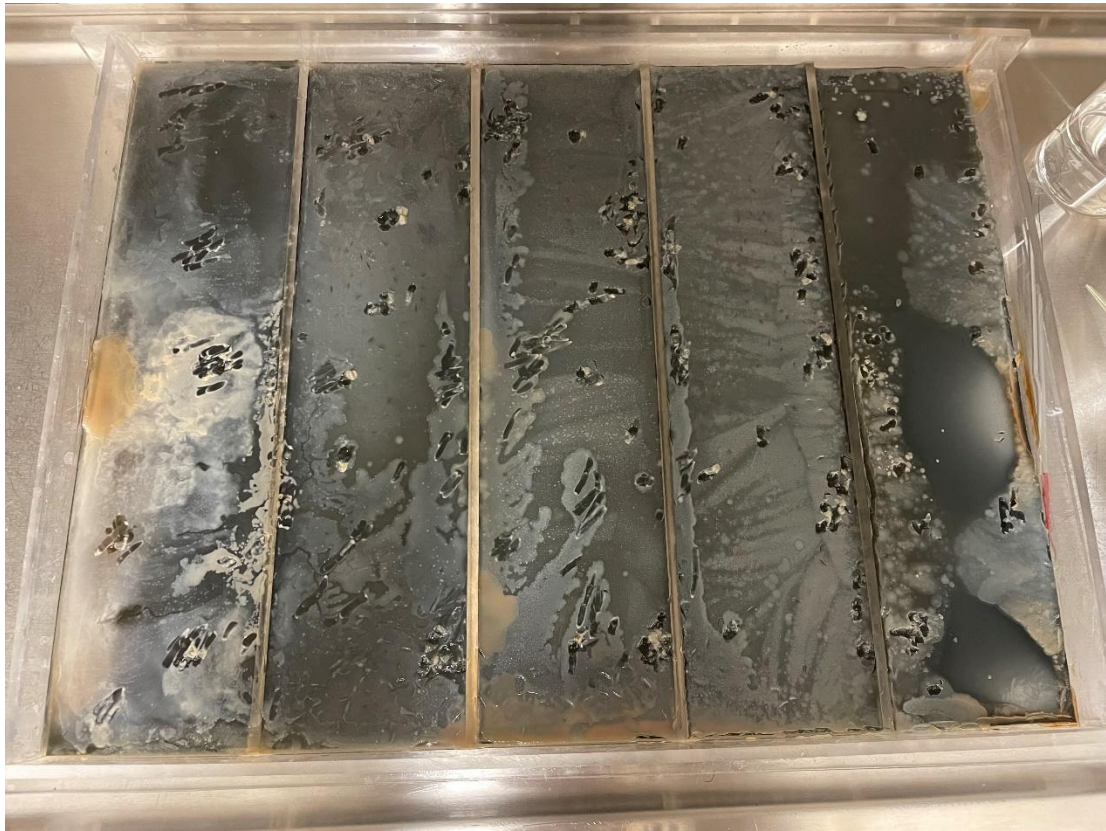


Figura 13. Placa de gentamicina con los puntos de muestra que se tomaron.

Fenotipo de las cepas resistentes al antibiótico gentamicina

Las cepas mostraron diferencias en el fenotipo del cultivo en placa únicamente en las muestras del carril 5 que contenía la mayor concentración del antibiótico, aunque no mostraron diferencias en el tiempo de cultivo como en el caso de la placa de meropenem, las colonias fueron de menor tamaño en comparación con los demás carriles (ver figuras 14, 15 y 16).

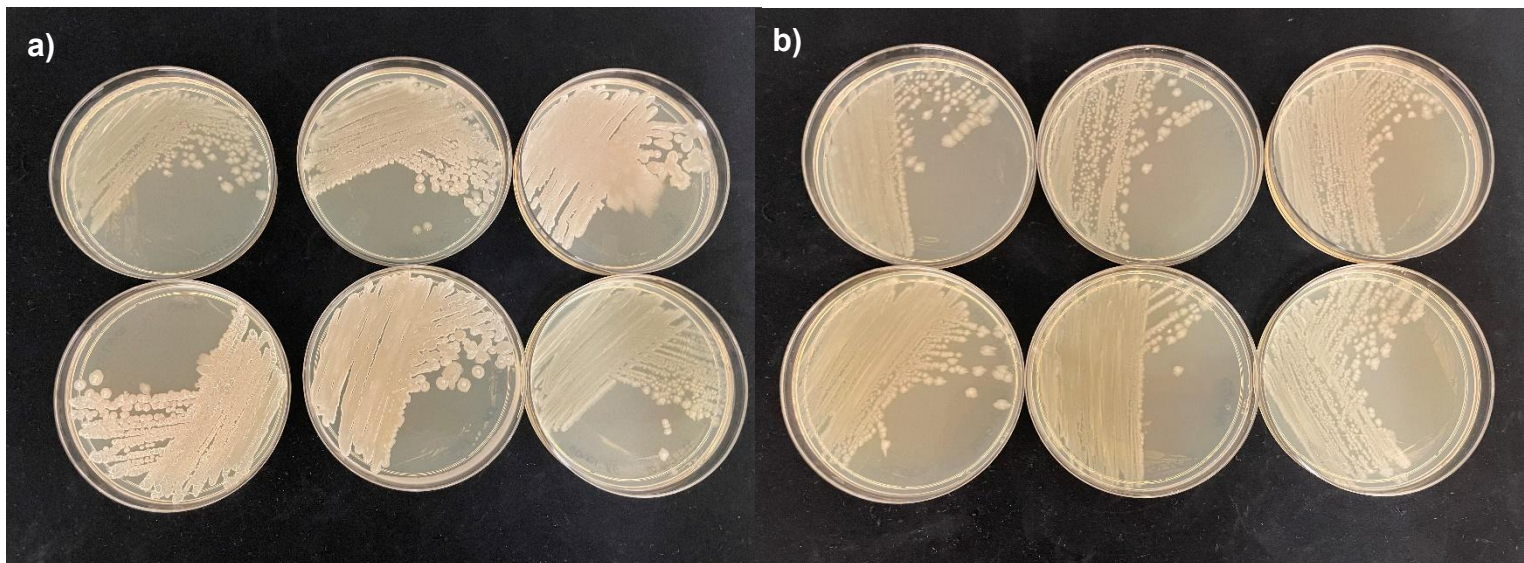


Figura 14. a) Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 1 sin antibiótico, b) crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 2 con 4 µg/ml de antibiótico.

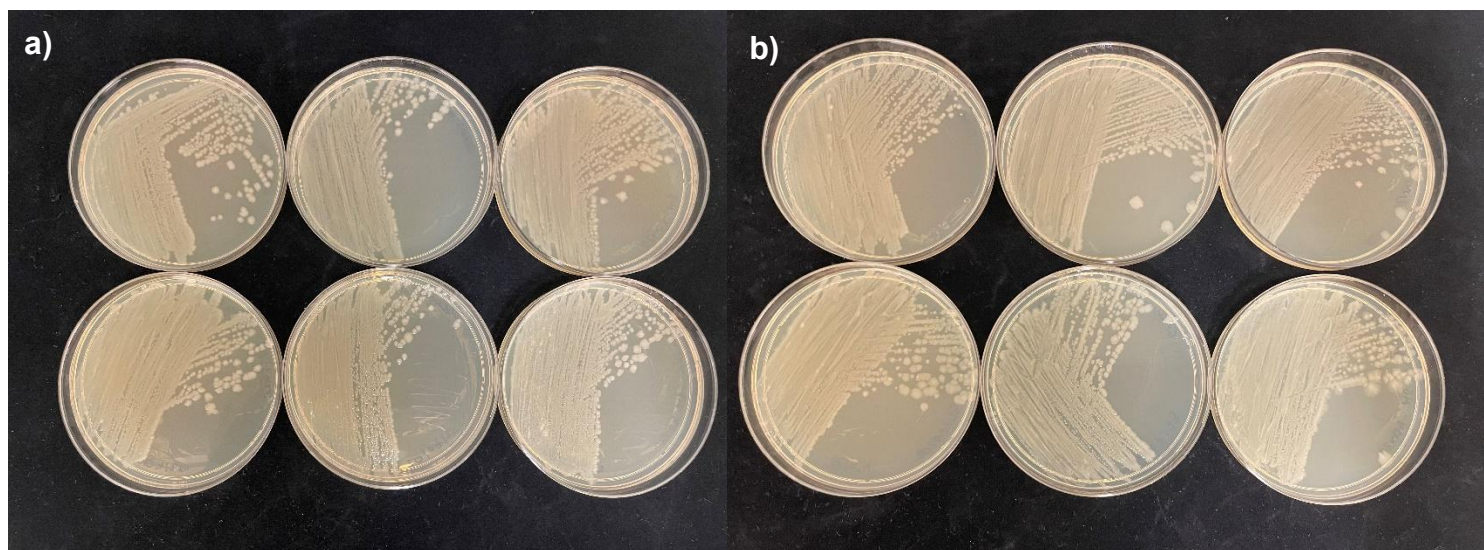


Figura 15. a) Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 3 con 40 µg/ml, b) crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 4 con 400 µg/ml del antibiótico gentamicina.

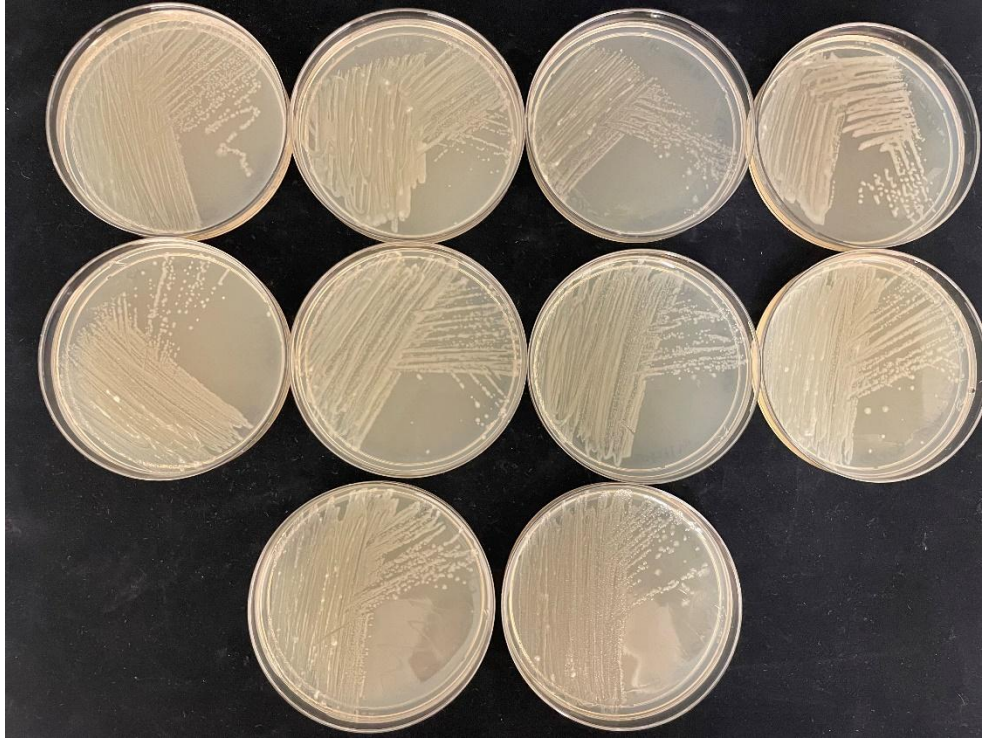


Figura 16. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 5 con 4,000 µg/ml del antibiótico gentamicina.

No se encontraron diferencias morfológicas tan marcadas como en el desafío con el antibiótico meropenem. No obstante, las bacterias presentaron morfología de bacilos alargados en los carriles 1 y 2. A partir del carril 3, se encontraron bacterias con morfología filamentosa (ver figuras 17 y 18).

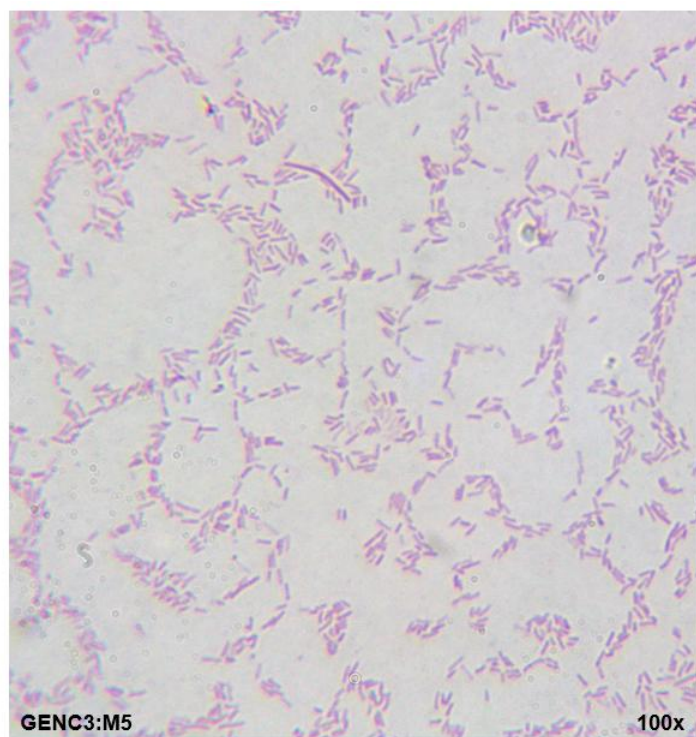
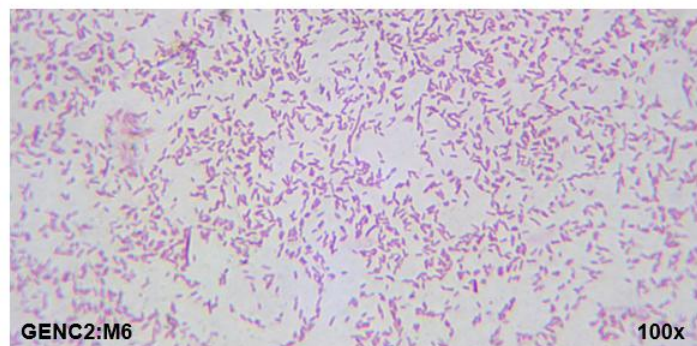
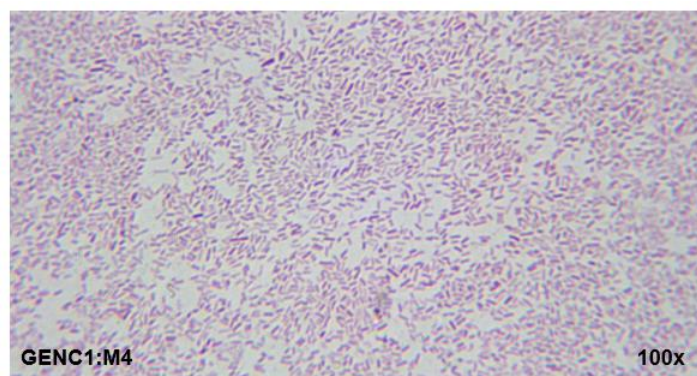


Figura 17. Tinción de Gram de las muestras obtenidas de los carriles 1, 2 y 3. GEN=gentamicina, C= N° de carril, M= N° de muestra del mismo carril.

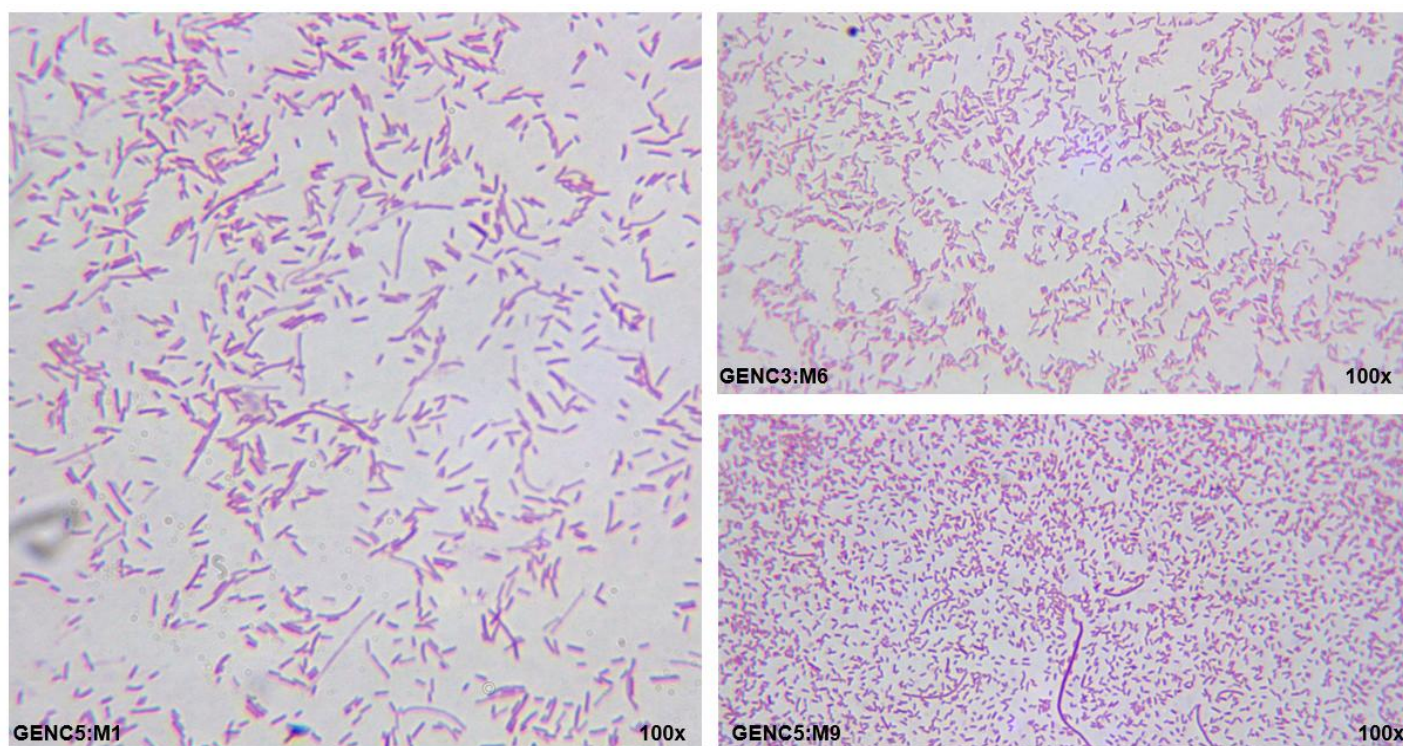


Figura 18. Tinción de Gram de las muestras obtenidas de los carriles 3 y 5.
GEN=gentamicina, C= N° de carril, M= N° de muestra del mismo carril.

Crecimiento de la MEGA-plate para la combinación de los antibióticos meropenem y gentamicina

La placa combinada con los antibióticos gentamicina y meropenem se incubó durante 22 días. Durante este periodo, no se observó evolución que permitiera el paso a los carriles 4 y 5 (ver figura 18). Se observó un crecimiento lento en la transición del carril 2 al 3. La bacteria tardó más de 10 días en colonizar el carril y no logró invadirlo por completo.

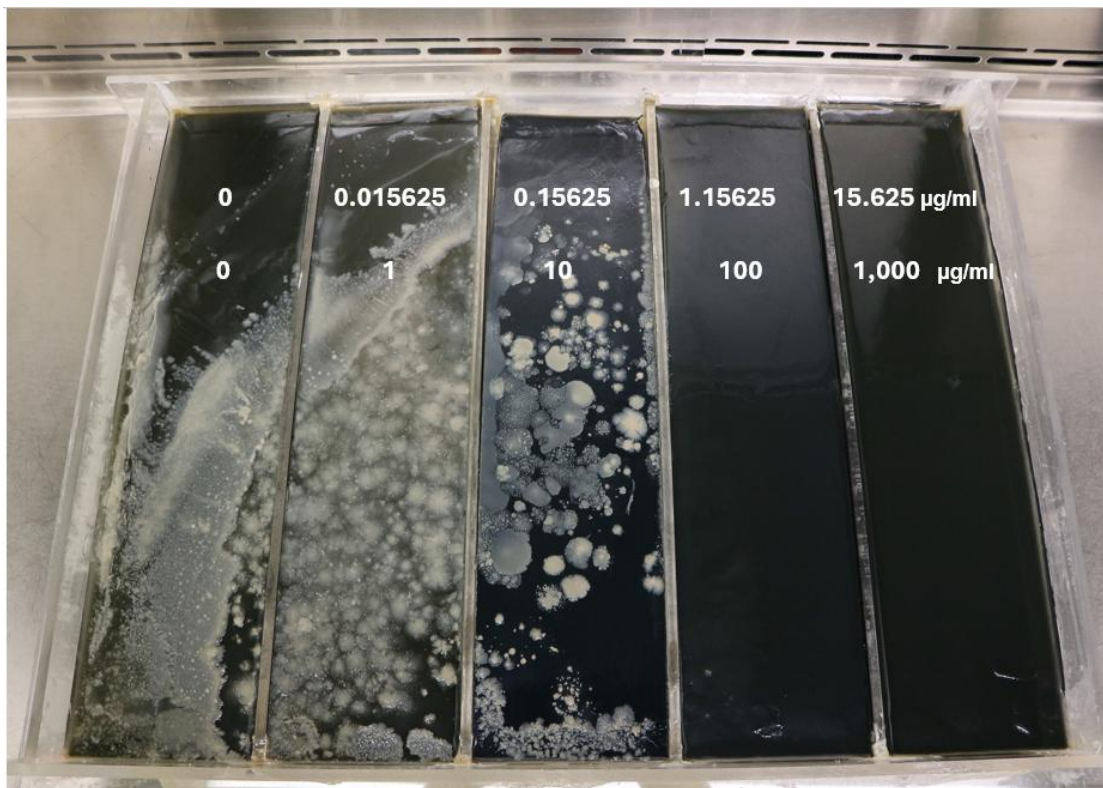


Figura 19. Crecimiento de la bacteria *E. coli* después de 22 días de exposición a los antibióticos meropenem y gentamicina en combinación.

6. Fenotipo de las cepas resistentes a los antibióticos en combinación

Se obtuvieron 9 cepas del carril 1 sin antibiótico, las cuales mostraron diferencias fenotípicas, como se observa en la figura 19. Se encontró variación en el tamaño de las colonias; sin embargo, no hubo diferencias en el tiempo de crecimiento.

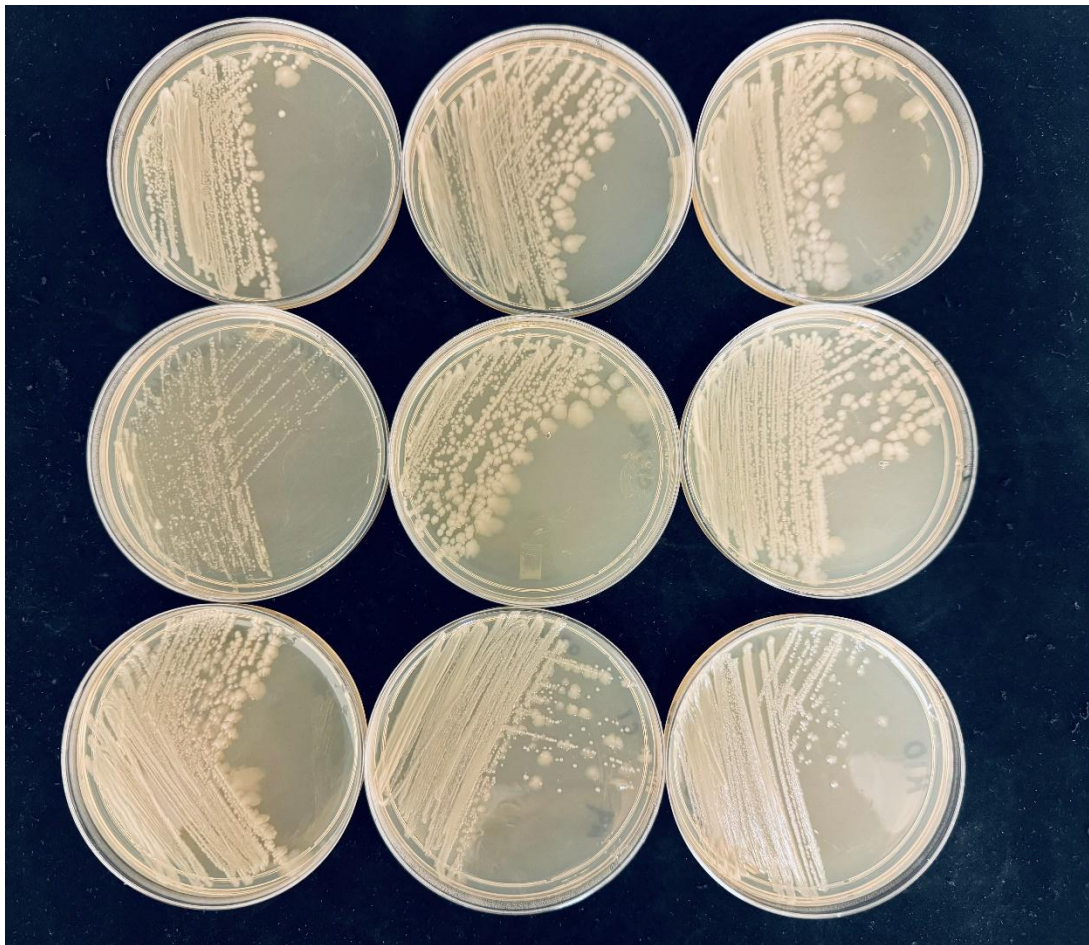


Figura 20. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 1 sin antibiótico.

En el carril 2 se logró aislar 8 cepas las cuales presentan colonias de menor tamaño que las que se obtuvieron en el carril 1 (ver figura 20). En el caso de las cepas del carril 3, se intentó aislar 16 cepas; no obstante, solo crecieron 8, mostrando morfologías no definidas y muy pocas colonias (ver figura 21). El periodo de crecimiento para estas bacterias fue de 5 días.

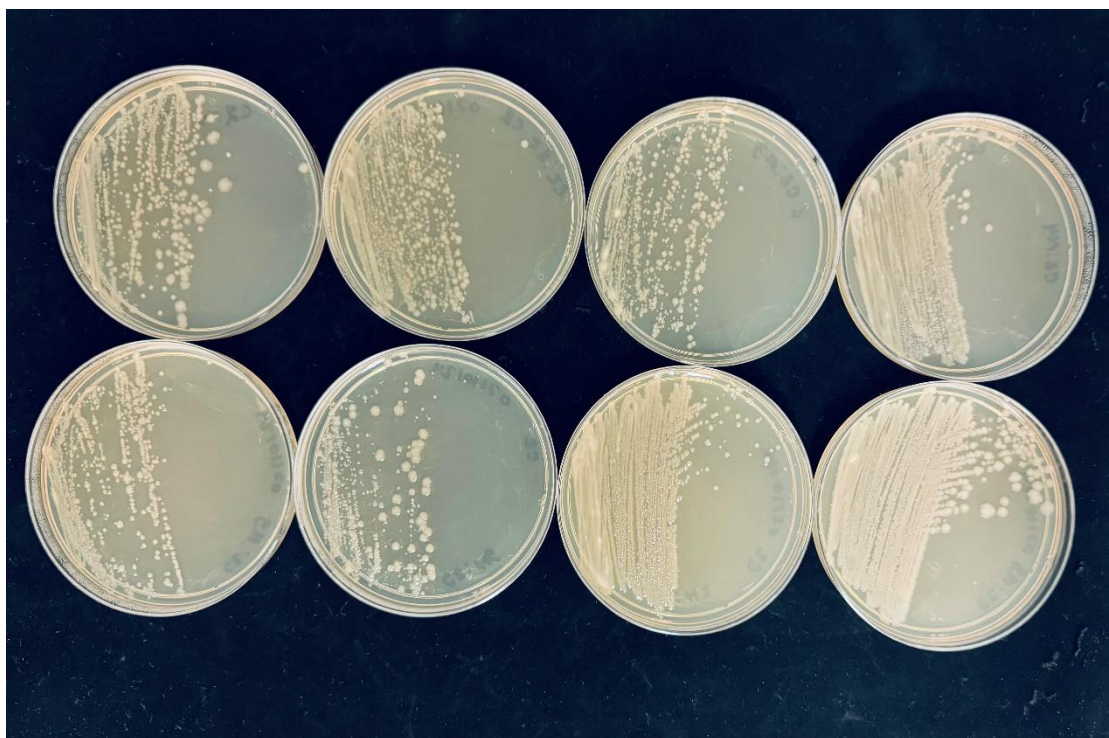


Figura 21. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 2 con el antibiótico meropenem y gentamicina en combinación.

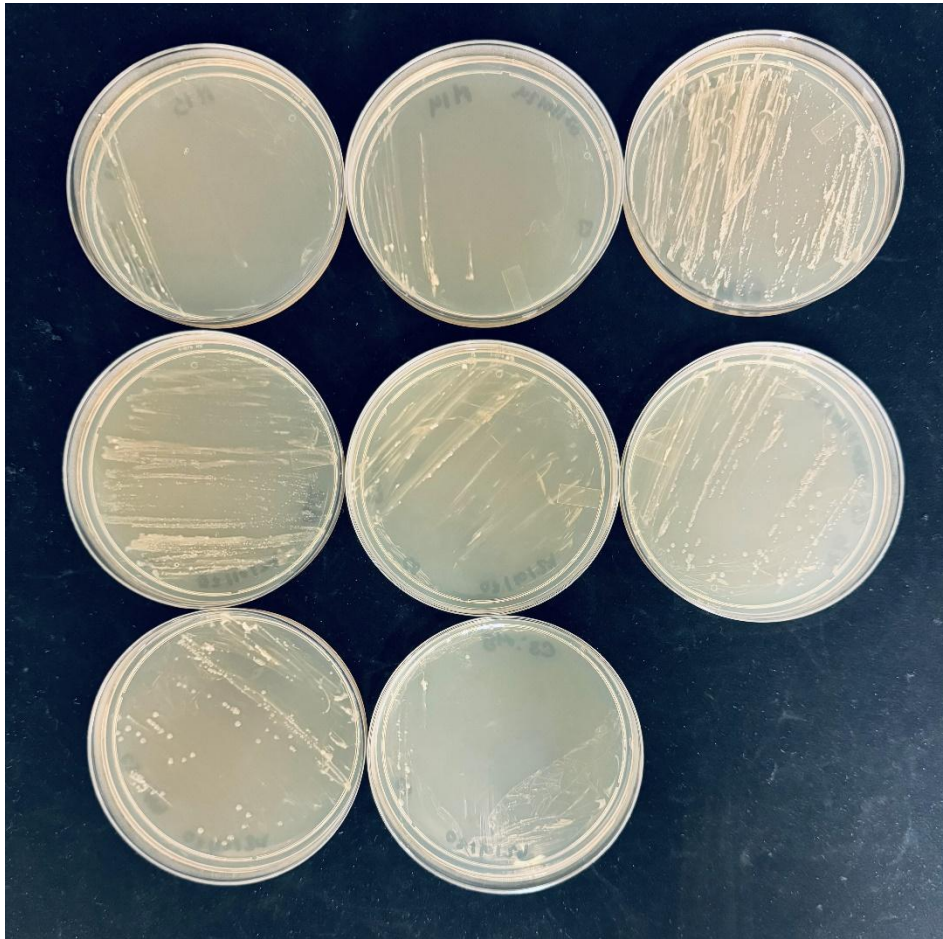


Figura 22. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 3 con el antibiótico meropenem y gentamicina en combinación.

Se encontraron bacterias con morfología filamentosa en el carril 1. No todas las bacterias presentaron este fenotipo, como en el caso de las cepas aisladas durante el desafío con el antibiótico meropenem (ver figuras 22, 23 y 24).

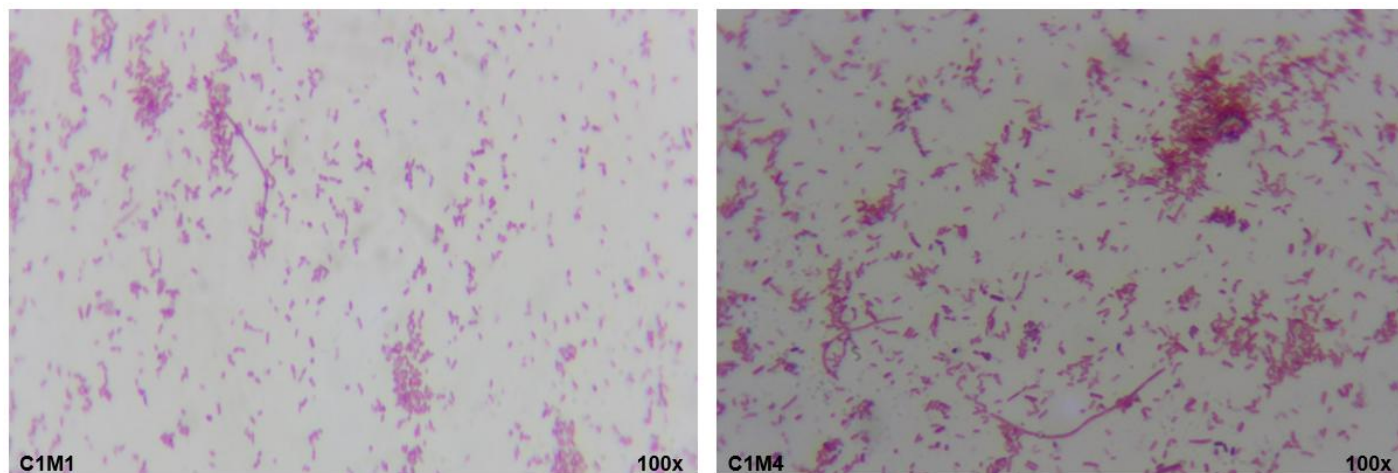


Figura 23. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 1 sin antibiótico. C1= N° de carril, M= N° de muestra.

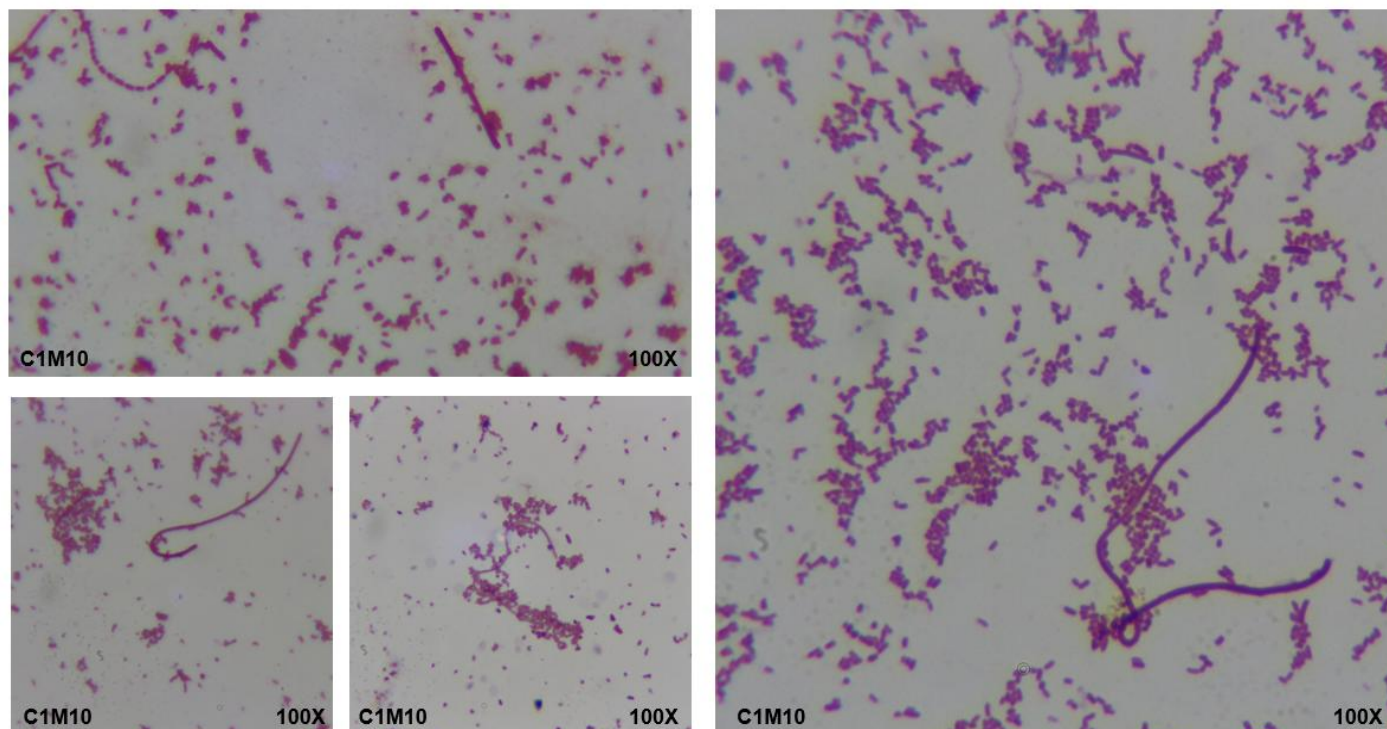


Figura 24. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 1 sin antibiótico. C1= N° de carril, M= N° de muestra.

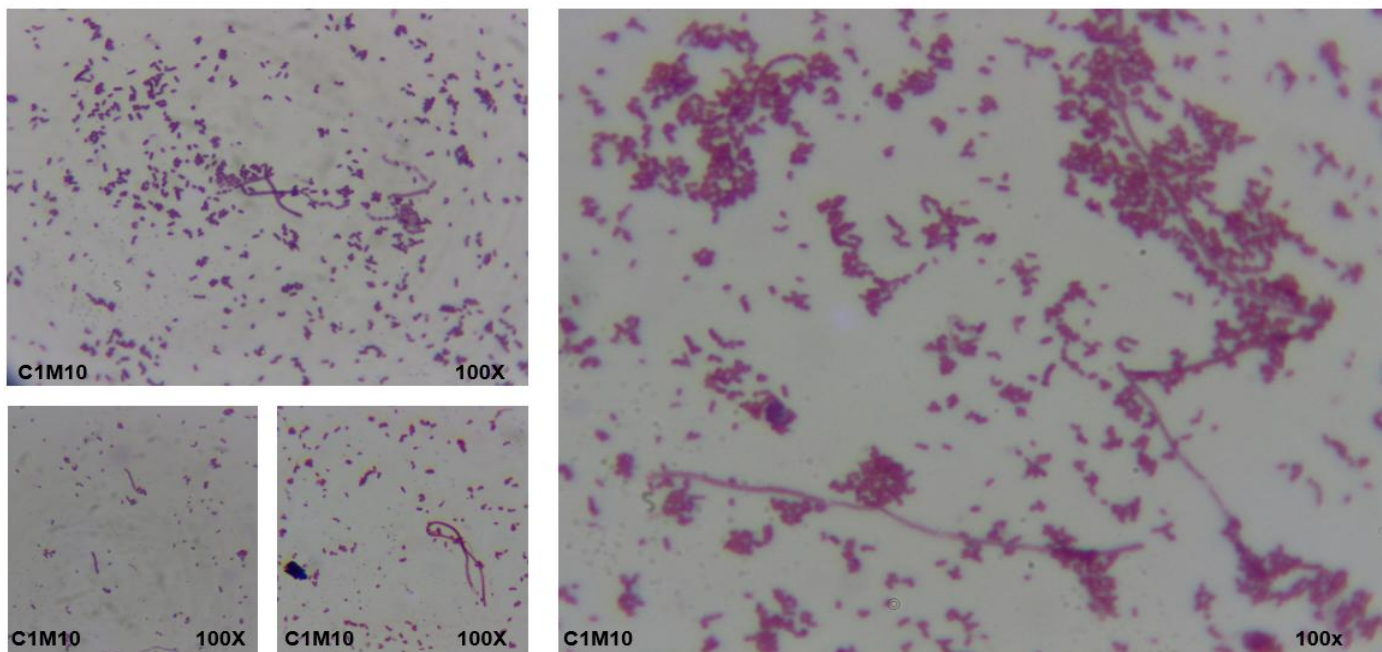


Figura 25. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 1 sin antibiótico. C1= N° de carril, M= N° de muestra.

Las cepas correspondientes al carril 2 no presentaron la morfología filamentosa observada en el carril 1, y algunas muestras mostraron morfología circular. Todas las cepas del carril 3 tienen morfología circular y algunas presentan bacilos alargados (ver figuras 25, 26 y 27).

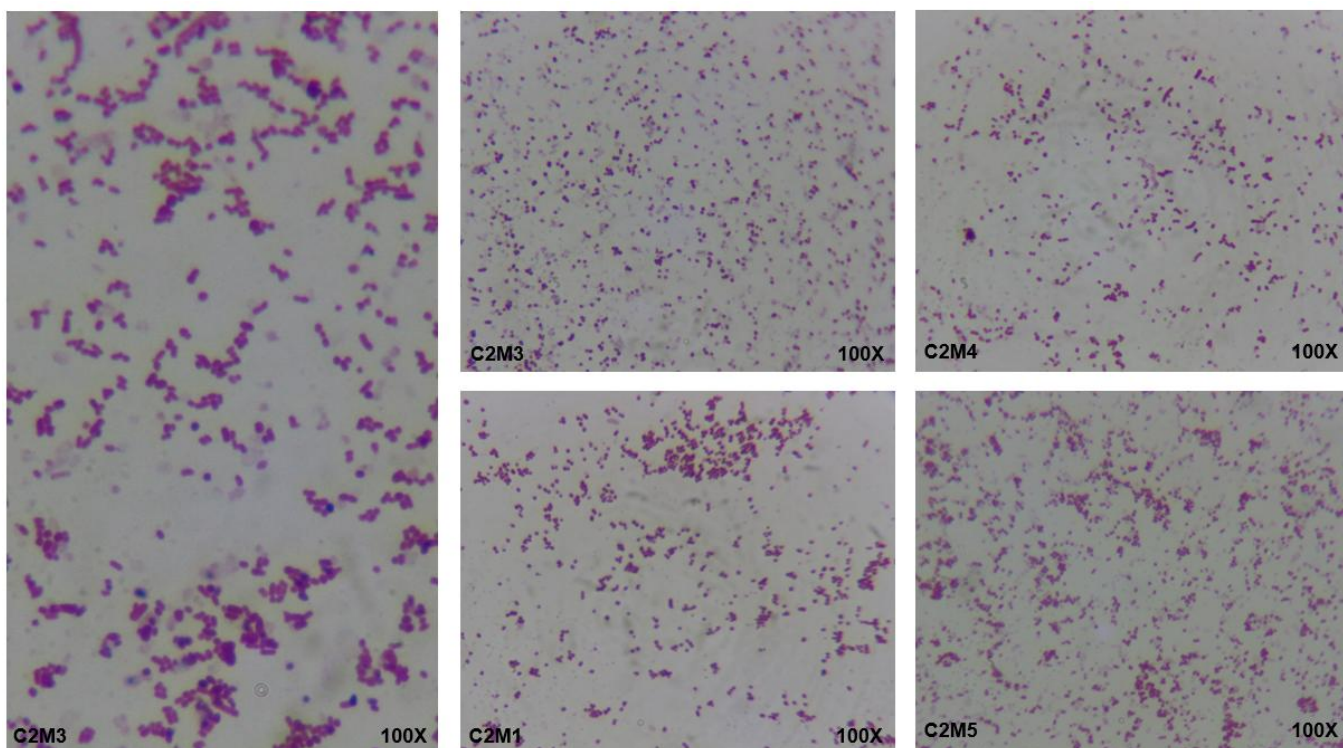


Figura 26. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 2 con antibiótico. C2= N° de carril, M= N° de muestra.

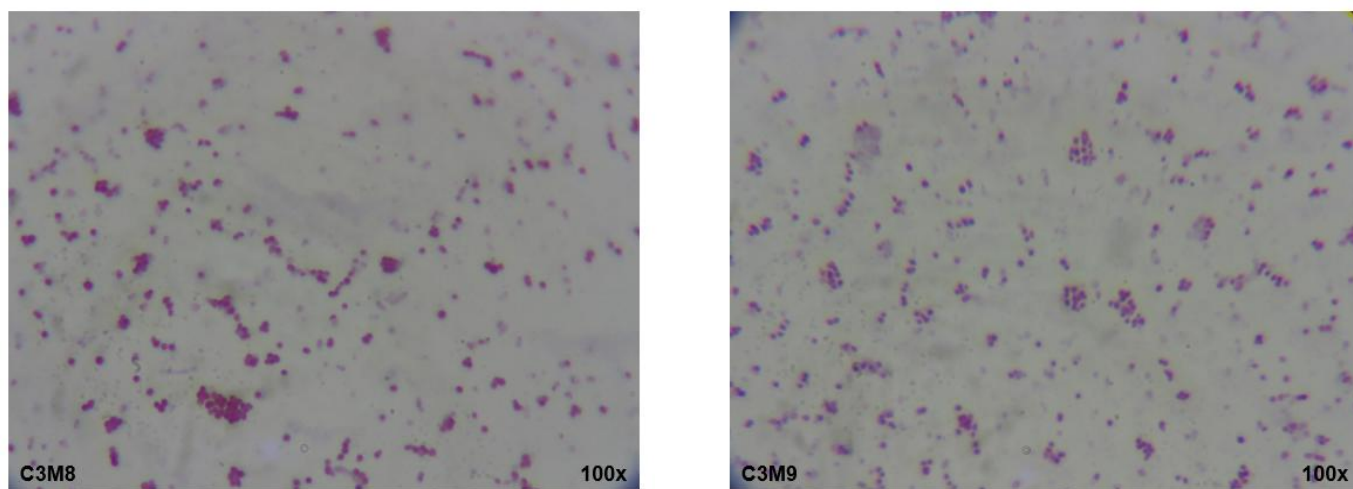


Figura 27. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 3 con antibiótico. C3= N° de carril, M= N° de muestra.

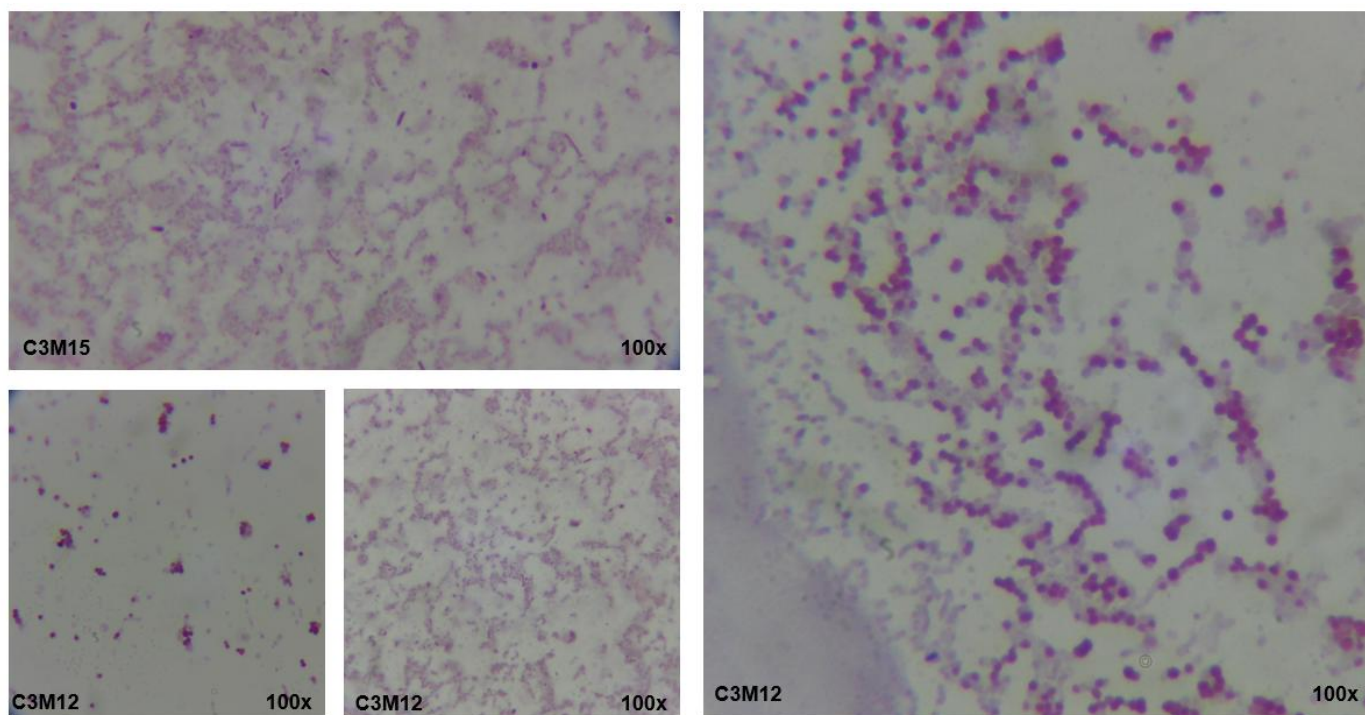


Figura 28. Crecimiento de la bacteria *E. coli* del carril 3 con antibiótico. C3= N° de carril, M= N° de muestra.

Análisis bioinformáticos de la MEGA-plate con el desafío de los antibióticos meropenem y gentamicina.

Se construyó la base de datos de los 8 y 10 genomas de las muestras obtenidas de la placa del antibiótico meropenem y gentamicina de los 5 carriles con las concentraciones (0x, 1x, 10x, 100x, 1000x) respecto a la MIC obtenida, con un total de 325 ARG para el caso del antibiótico meropenem siendo 57 genes únicos que confieren resistencia a 20 antibióticos diferentes incluidos los antibióticos penam, penem y carbapenémicos específicamente los genes; *acrB*, *AcrE*, *AcrS*, *CPR*, *E. coli acrA*, el gen *E. coli AcrAB-TolC with AcrR y MarR mutation*, *E. coli ampC beta-lactamase*, *E. coli soxR*, *E. coli soxS*, *evgA*, *evgS*, *gadX*, *Haemophilus influenzae PBP3*, *H-NS*, *marA*, *mdtE*, *mdtF* y *Tolc*. También se encontraron ARGs desinfectantes y antisépticos (ver anexo I). En el caso de los genomas de las muestras obtenidas de la placa con el antibiótico gentamicina encontramos 378 ARGs con 37 genes únicos, mostrando también ARGs para 20 antibióticos diferentes incluidos los ARGs *baeR*, *baeS*, *K. pneumoniae KpnE*, *K. pneumoniae KpnF* que confieren resistencia a los aminoglucósidos, así como ARGs para antisépticos y desinfectantes (ver anexo I). Todos los ARGs encontrados para ambos antibióticos cumplen con los criterios estrictos determinadas en la base de datos CARD.

En el caso de las 8 muestras de meropenem; las muestras, M2, M4, M6, y M7 comparten la mayoría de los ARGs mientras que las muestras M1,

M3, M5 y M8 se encuentran separadas como se puede observar en el mapa de calor y en la red de asociación que corresponde a los ARGs que comparten las muestras entre sí (ver figura 18 y 19). Los genes *AcrS*, *eptA*, *E. coli emerE*, *evgA*, H-NS y *VanG*, se encontraron presentes en todas las muestras. Los genes EC-13, y *leuO* se encontraron en la muestra M1 y el gen *E. coli* UHPT se encontró solo en la muestra M8. Los demás genes se comparten entre todas las muestras.

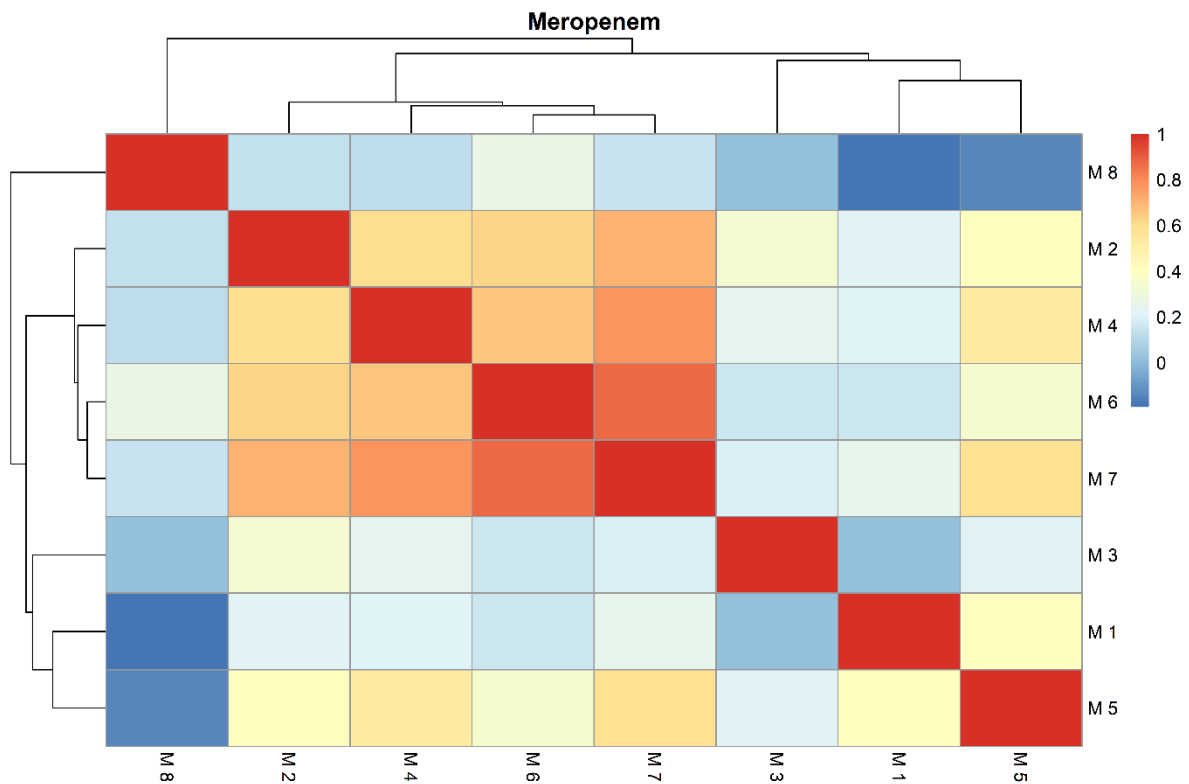


Figura 29. Mapa de calor de las 8 muestras obtenidas con el antibiótico meropenem.

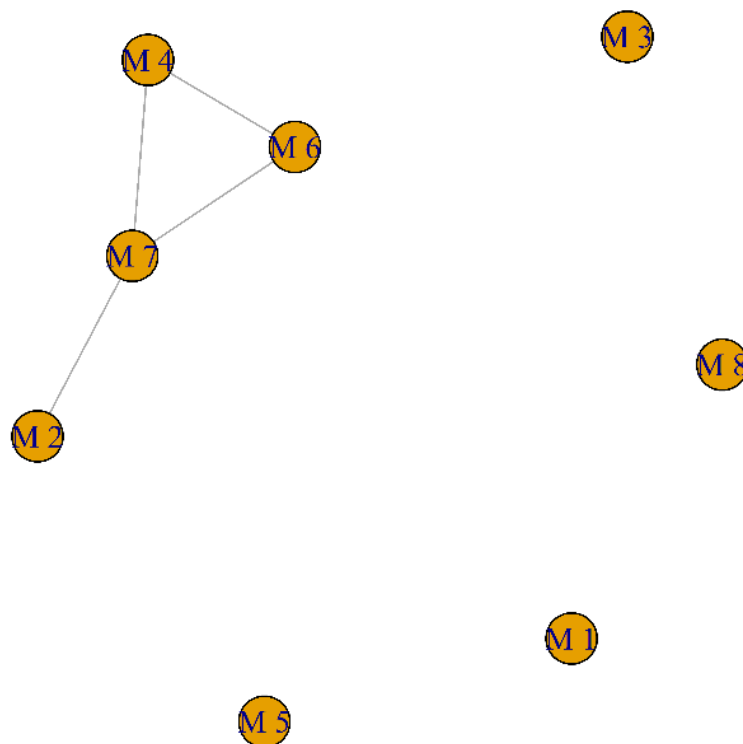


Figura 30. Red de asociación de las 8 muestras de meropenem M= Número de muestra.

El mecanismo de resistencia detectado en las muestras de meropenem fue el sistema de bombas de eflujo principalmente, alteración de la diana de los antibióticos e inactivación de antibióticos. En el caso de las bombas de eflujo se encontró la presencia de las familias: el transportador de casete de unión a ATP (ABC), la superfamilia de facilitadores mayores (MFS), la pequeña resistencia a múltiples fármacos (SMR) y las familias de división de nodulación de resistencia (RND). No se encontró la presencia de la familia de la extrusión de múltiples fármacos y compuestos tóxicos (MATE). Los genes *acrB*, *acrD*, *AcrE*, *AcrF*, *AcrS*, *adeF*, *baeR*, *cpxA*, *CRP*, *E. coli acrA*, *E. coli AcrAB-TolC*

with *AcrR* mutations, *E. coli AcrAB-TolC* with *MarR*, *gadx*, *marA*, *mdtA*, *mdtB*, *mdtC*, *mdtE*, *mdtF* and *rsmA* presentan el mecanismo de resistencia mediado por la bomba de eflujo RND. Mientras que los genes *E. coli soxR*, *soxS* with *mutation* and *TolC*, están relacionados con la presencia de las familias de las bombas de eflujo ABC, MFS y RND. Por otro lado, los genes *emrA*, *emrB*, *emrK*, *emrR*, *E. coli mdfA*, *mdtG*, *mdtH*, *mdtN*, *mdtO*, *mdtP* y *leuO* pertenecen al mecanismo de la bomba de eflujo MFS y los genes *E. coli emrE*, *K. pneumoniae kpnF* y *qacJ* corresponden a la familia SMR.

Los genes *ArnT*, *bacA*, *eptA*, *E. coli EF-TU*, *E. coli UhpT* y *VanG* están relacionados con el mecanismo de la alteración de la diana de los antibióticos. Los genes EC-13 y *E. coli ampc* beta-lactamase presentaron el mecanismo de inactivación del antibiótico. También encontramos la presencia del gen *kdpE* cuyo mecanismo de acción es el sistema de dos componentes KdpDE, este gen se encontró presente en todas las muestras a excepción de la muestra M8.

En el caso de las muestras cuyo desafío fue con el antibiótico gentamicina, las muestras M1, M2 y M6 son iguales en términos de los ARGs que comparten, así mismo las muestras M9 y M10, las muestras M3, M4, M5, M7 y M8 mantienen una correlación alta con las demás, esto se puede corroborar con la red de asociación y el mapa de calos de los ARGs presentes en la cual, todas las muestras están altamente relacionadas, no mostrando

diferencias como en el caso del antibiótico meropenem (ver figura 20 y 21). El gen *E. coli* UhpT se encontró presente en las muestras M1, M2, M3, M6, M7 y M8 y el gen *mdtF* se encontró en las muestras M1, M2, M6, M9 y M10, los demás genes se mantuvieron presentes en todas las demás. Los mecanismos de resistencia fueron los mismos encontrados con el antibiótico meropenem con mayor presencia de la familia RND de las bombas de eflujo con los genes; *Acrs*, *adeF*, *baeR baeS*, *CRP*, *E. coli AcraAB-TolC with MarR mutation*, *gadX*, *marA*, *mdtE*, *mdtF*, *rsmA*, y *Shigella flexneri acrA*. En el caso de la familia MFS se encontraron los genes *emrB*, *emrK*, *emrR*, *emrY*, *leuO*, *mdtM*, *mdtN*, *mdtP* y *mdtP*. Para la familia SMR se encontraron los genes *E. coli emrE*, *K. pneumoniae KpnE* y *KpnF*, así como el gen *qacJ*. Únicamente el gen *mbsA* pertenece a la familia ABC de las bombas de eflujo. Para el mecanismo de inactivación del antibiótico solo el gen ACT-17 presentó este mecanismo. No se encontró ARGs relacionados con la presencia de las tres familias (ABC, MFS and RND), como en el caso del antibiótico meropenem, no obstante, los genes *evgA*, *evgS* y H-NS presentan el mecanismo de resistencia para las familias MFS y RND.

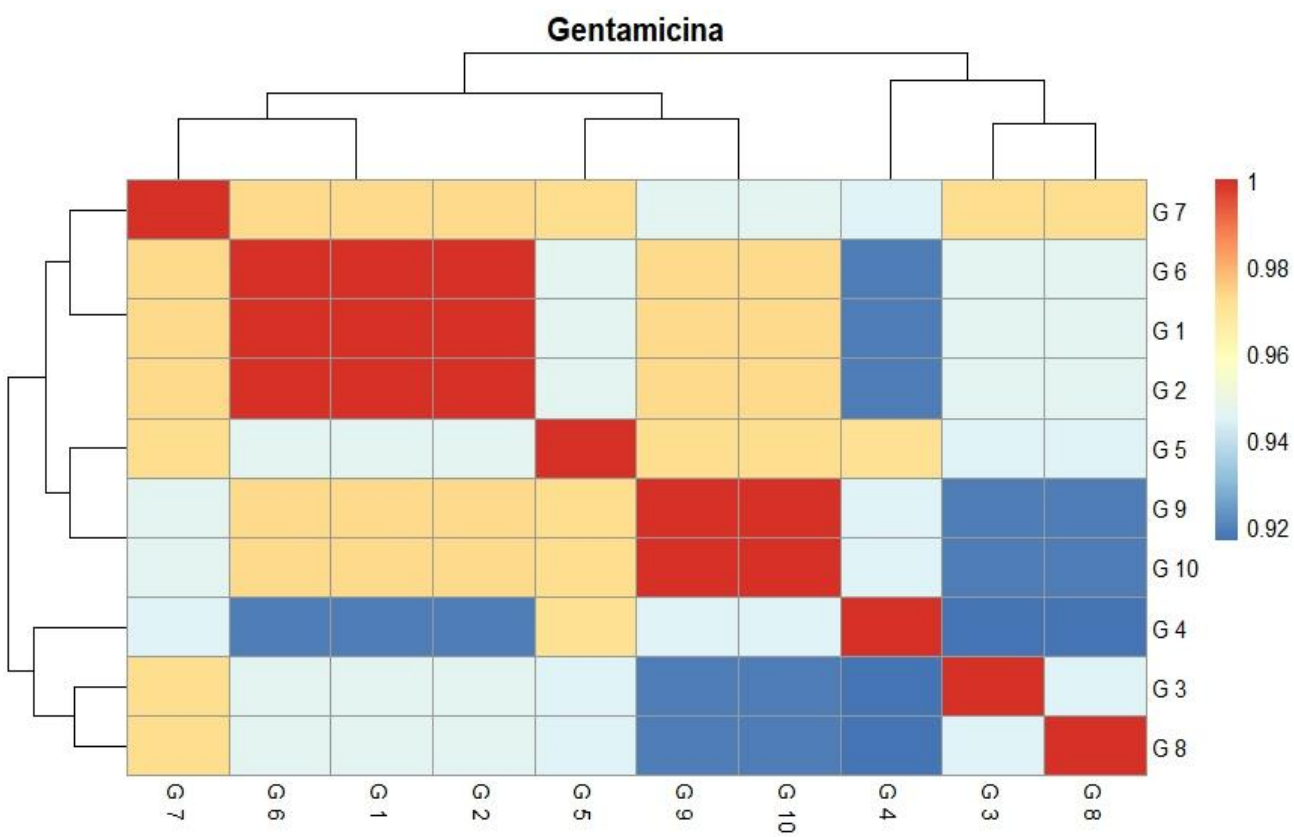


Figura 31. Mapa de calor de las 10 muestras obtenidas con el antibiótico gentamicina.

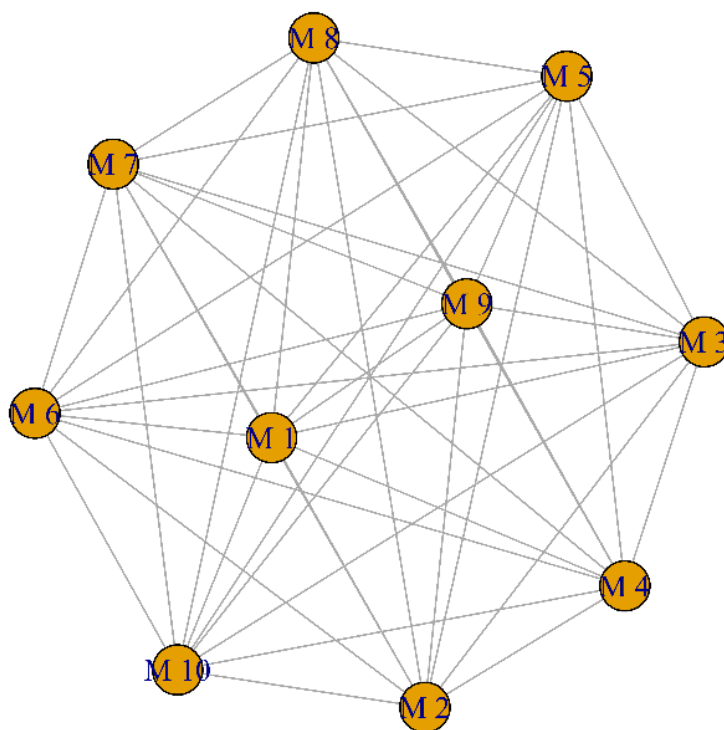


Figura 32. Red de asociación de las 10 muestras del antibiótico M= Número de muestra.

En ambos desafíos se encontraron ARGs con modificaciones en polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Para el caso de meropenem encontramos cambios en 5 ARGs; *E. coli* AcrAB-TolC with *MarR* mutations, *E. coli* EF-Tu, *E. coli* GlpT, *E. coli* UhpT, *H. influenzae* PBP3, con los SNPs Y137H, G103S, R234F, E448K, E350Q, D350N, S357N. Con el antibiótico gentamicina se encontraron en 3 genes con cambios a nivel de SNPs en; *E. coli* EF-Tu, *E. coli* UhpT, *H. influenzae* PBP3 con los SNPs; R234F, E350Q y D350N, S357N respectivamente.

Meropenem, gentamicina y florfenicol

Se realizó la comparación entre los ARGs obtenidos en nuestro estudio con los genes obtenidos por Kerek et al. (2024) con el antibiótico florfenicol. Se encontraron un total de 64 genes únicos presentes en los tres antibióticos

Los tres antibióticos comparten los ARGs; *AcrS*, *baeR*, *CRP*, *emrB*, *emrK*, *emrR*, *emrY*, *eptA*, *E. coli emrE*, *evgA*, *evgS*, *gadX*, *H-NS*, *marA*, *mdtE*, *mdtF*, *mdtM*, *mdtN*, *mdtO*, *mdtP*, *msbA*, *pmrF*. Lo cual resalta la relevancia de estos 22 genes que están presentes en 3 grupos diferentes de antibióticos (carbapenémicos, aminoglucósidos y fenicoles) que pueden estar jugando un rol importante en la aparición de la resistencia en varios grupos de antibióticos.

Se encontraron genes únicos que no se comparten entre los 3 antibióticos; Los genes *E. coli ampH*, *gadW*, *ugd* están presentes en antibiótico florfenicol, mientras que los genes EC-13, *E. coli AcrAB-TolC* with *AcrR* mutation, *E. coli GlpT*, *E. coli soxR* y *soxS* se encontraron presentes solo en las muestras desafiadas con el antibiótico meropenem y en el caso del antibiótico gentamicina se encontraron los genes ACT-17 y *Shigella flexneri acrA*. (Ver figura 22).

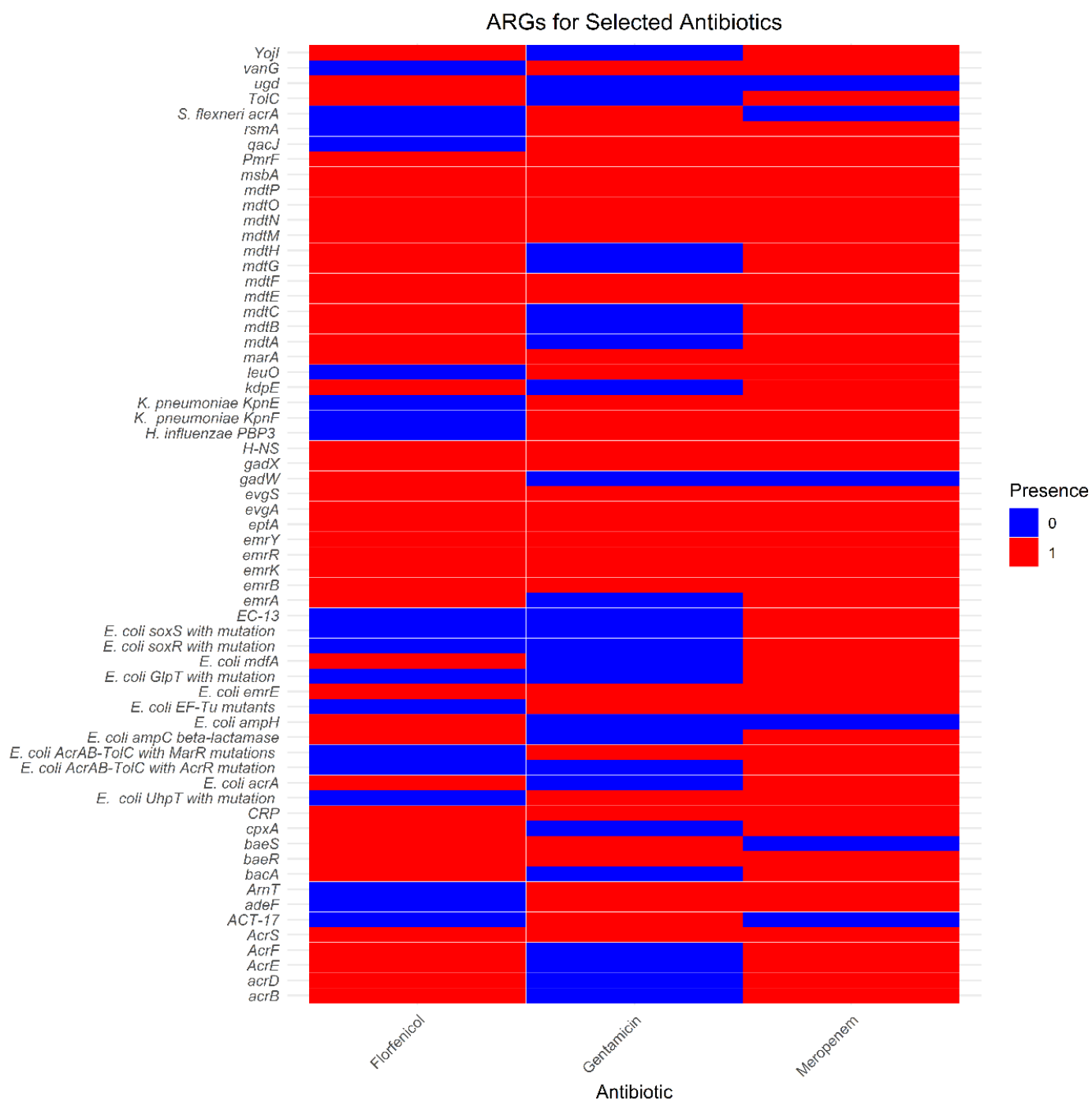


Figura 33. Mapa de calor que muestra la presencia de genes de resistencia a antibióticos en *E. coli* con los antibióticos meropenem, gentamicina y florfenicol. Los cuadros en rojo representan la presencia de un gen de resistencia en los antibióticos analizados, mientras que los cuadros en azul representan la ausencia de un gen de resistencia.

Funciones biológicas

En relación con los análisis de las funciones biológicas de los ARGs encontrados mediante el uso del programa ClueGo gene ontology enrichment plugin, pudimos establecer las ontologías de los diferentes ARGs que se obtuvieron con los antibióticos gentamicina y meropenem, así como realizar la comparación con los datos obtenidos por Kerex et al (2024) con el antibiótico florfenicol (ver anexo II).

En el caso del antibiótico meropenem y gentamicina se encontraron 5 grupos diferentes que corresponden a: La regulación positiva de la expresión génica, transporte de sulfatiazol, respuesta a medicamentos, respuesta a antibióticos y transducción de señales intracelulares. El antibiótico florfenicol presentó 7 grupos de funciones biológicas (ver anexo II): Proceso catabólico de metilglioxal a D-lactato a través de S-lactoil-glutación, proceso metabólico de lipopolisacáridos, exportación de fármacos, respuesta a antibióticos, respuesta a medicamentos, sistema de transducción de señales por fosforrelé y transporte de sulfatiazol (ver figura 23, 24 y 25).

Se realizó el análisis con los ARGs que presentaron los tres antibióticos y se encontraron 7 grupos; Proceso catabólico de metilglioxal a D-lactato a través de S-lactoil-glutación, proceso metabólico de lipopolisacáridos, respuesta a antibióticos, respuesta a medicamentos, exportación de medicamentos, sistema de transducción de señales por fosforrelé y transporte

[illegible]

Gentamicina ARGs

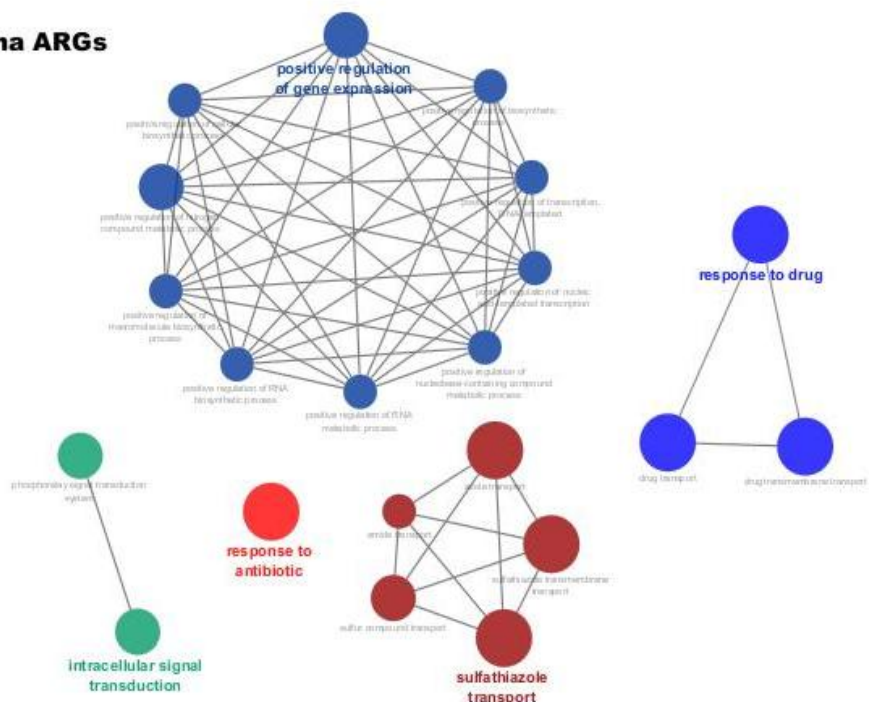


Figura 35. Funciones biológicas asociadas a los ARGs obtenidos del desafío con el antibiótico gentamicina.

Florfenicol ARGs

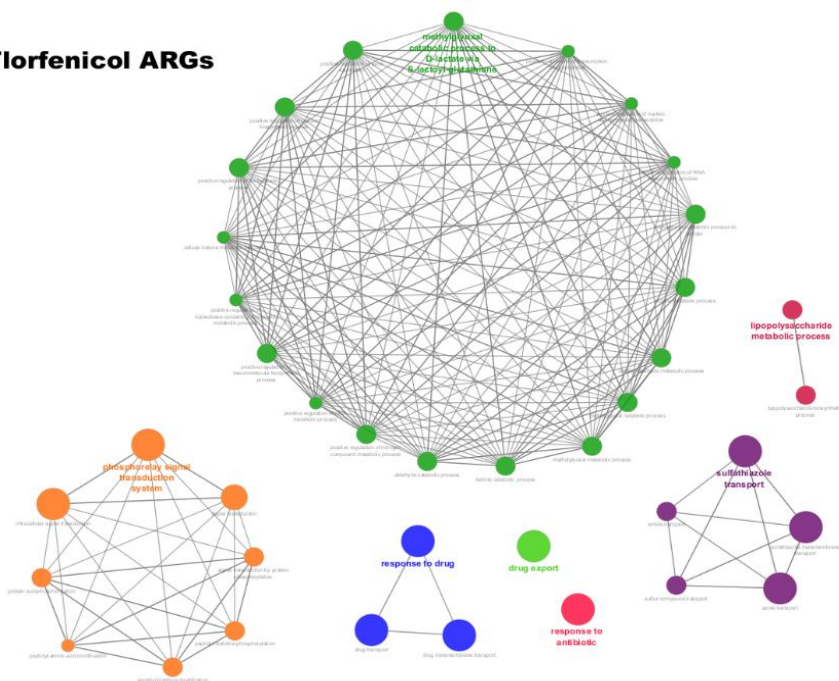


Figura 36. Funciones biológicas asociadas a los ARGs obtenidos del desafío con el antibiótico florfenicol.

ARGs de meropenem, gentamicina y florfenicol

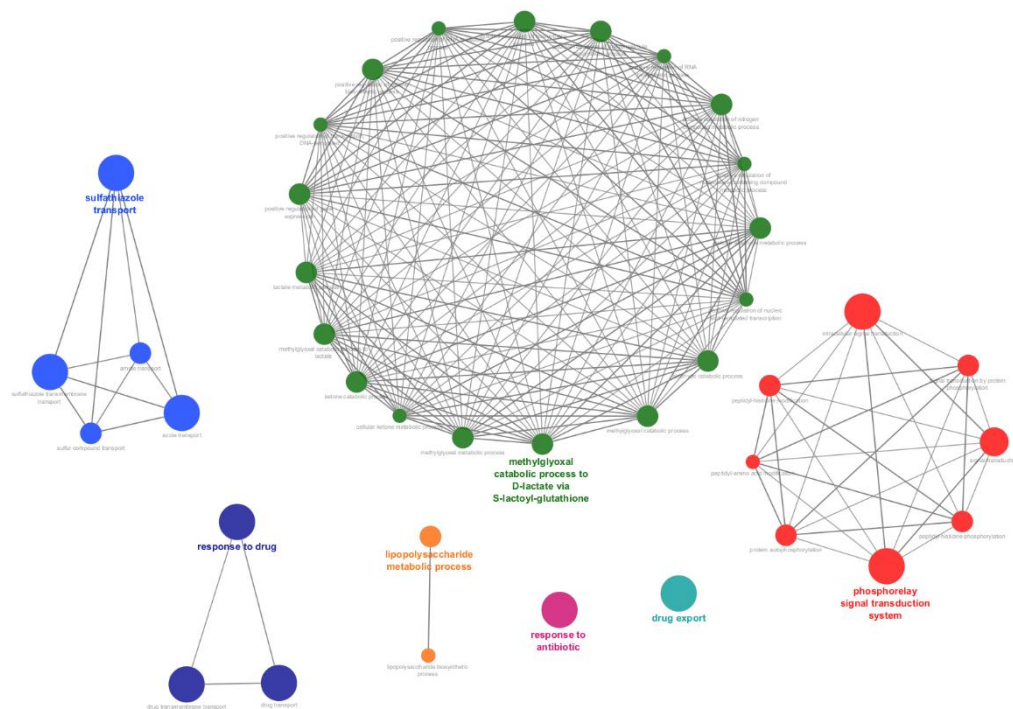


Figura 37. Funciones biológicas asociadas a los ARGs obtenidos de los antibióticos meropenem gentamicina y florfenicol.

ARGs únicos

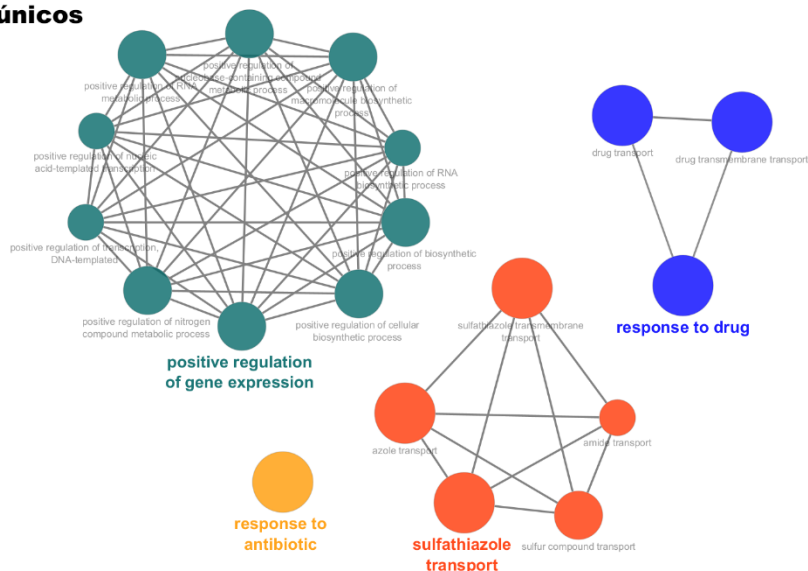


Figura 38. Funciones biológicas asociadas a los 22 ARGs que comparten los antibióticos meropenem gentamicina y florfenicol.

CAPÍTULO 6

7. Discusión

Estudiar los mecanismos evolutivos de adaptación en la resistencia a antibióticos es clave para entender su rápida propagación en diversos entornos. El sistema MEGA-plate permite observar cambios adaptativos de mutación y selección en múltiples linajes coexistentes, así como la diversificación fenotípica y genotípica constante en esta dinámica evolutiva (Baym et al., 2016). Esto se observó en los desafíos con los antibióticos gentamicina, meropenem en combinación y por separado. Particularmente llama la atención los resultados del desafío con el antibiótico meropenem en el MEGA-plate, ya que mostraron variaciones en los ARGs de las muestras, siendo las muestras M1, M3, M5 y M8 las que presentaron mayores diferencias en los ARGs encontrados, estas variaciones pueden indicar diversas estrategias que la bacteria desarrolla para resistir concentraciones más altas del antibiótico meropenem. Se sabe que, en poblaciones bacterianas sensibles a determinados antibióticos, pueden surgir bacterias resistentes por mutaciones (Lipsitch and Samore, 2002), y se infiere que el tamaño de la población es un factor importante que favorece la selección de las mismas (Blondeau, 2009). Sin embargo, no todas las bacterias resistentes sobreviven a las concentraciones más altas de antibiótico, como demostró Baym et al. (2016), con el antibiótico trimetoprima, donde bacterias susceptibles, pero no

altamente resistentes llegaron a las concentraciones más altas en el desafío de la MEGA-plate, las mutantes altamente resistentes quedaron atrapadas por la propagación mayor de cepas que eran más sensibles. En nuestro trabajo, aunque no secuenciamos un mayor número de muestras, encontramos diferencias significativas en las muestras tomadas a lo largo de todo el desafío, lo que nos da pauta para explicar la variación encontrada con el antibiótico meropenem. Las muestras M1, M5 y M6, particularmente, presentaron más ARGs que la muestra del carril 5 con la mayor concentración del antibiótico.

En sistemas de alta densidad y concentraciones elevadas de antibióticos, se ha demostrado que las bacterias presentan diferentes estrategias de supervivencia, no todas con resultados positivos para el linaje (Baym et al., 2016). Por otro lado, la homogeneidad encontrada en las muestras de gentamicina en nuestro trabajo y las muestras de florfenicol en el trabajo de Kerek et al. (2024), hace referencia a una estabilidad en la presencia de ARGs, lo que indica una estrategia diferente de respuesta a los aminoglucósidos y fenicoles, probablemente relacionada con el mecanismo de acción de cada grupo de antibióticos.

El meropenem, un antibiótico β -lactámico de la clase de los carbapenémicos, actúa inhibiendo las proteínas de unión a la penicilina, lo que impide la reticulación de las cadenas de peptidoglicano en la pared celular y provoca la lisis celular (Drusano, 1997; Thomson et al., 2022). Para el caso del

meropenem diversas estrategias de resistencia se han reportado en la familia *Enterobacteriaceae*, como la respuesta SOS en un estado de mutagénesis y reparación del ADN (Bos et al., 2015), la aparición de esferoplastos (Cross et al., 2019), y la relación de la RAM con funciones biológicas clave para la división celular, la síntesis y mantenimiento de la envoltura celular, el metabolismo de ATP y la regulación de la transcripción (Thomson et al., 2022). También se ha documentado la aparición de bacterias persistentes (J. S. Lee et al., 2019; Urbaniec et al., 2023).

En el caso de la gentamicina, no se ha reportado la activación del sistema SOS, ni cambios morfológicos notables, lo que sugiere respuestas más estables. Sin embargo, se ha demostrado que, tras la exposición a gentamicina en *E. coli*, disminuye la concentración de ribosomas, ya que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a los ribosomas 30S. Además, se observó que las bacterias presentaban alargamiento celular en comparación con las cepas control no expuestas al antibiótico, similar a la morfología que encontramos en nuestro trabajo a partir del carril 2 (Muhamad Hendri et al., 2024). Esta estrategia menos variada que en el caso del meropenem, coincide con el mantenimiento de los ARGs en gentamicina, ya que las respuestas tienden a ser más estables sin cambios morfológicos drásticos. En el desafío con los antibióticos en combinación, se demostró que las terapias combinadas con carbapenémicos y aminoglucósidos, son una buena opción para contrarrestar la RAM y la MDR, como se había establecido

previamente (Terbtothakun et al., 2021), debido a que la bacteria no logró evolucionar por completo hasta los carriles que tenían la mayor concentración de los antibióticos. Además de mostrar cambios a nivel morfológico en los primeros carriles a diferencia de los cambios observados en la bacteria con los antibióticos por separado. Un ejemplo de esto es la morfología circular encontrada en muestras del carril 5 en el desafío de meropenem, mientras que, en la placa combinada, esta morfología se presentó en los carriles 2 y 3. Esto nos indica que esta estrategia es la última que la bacteria emplea para sobrevivir a la exposición a altas concentraciones de antibióticos. Sin embargo, en la terapia combinada se encontraron a la mitad del desafío, limitando la capacidad de la bacteria para crecer en concentraciones más altas.

Los genes *AcrS*, *eptA*, *E. coli emerE*, *evgA*, *H-NS* y *VanG*, presentes en todas las muestras expuestas a meropenem, ya han sido ampliamente descritos, al igual que su rol en la aparición de la RAM en microorganismos de interés clínico (Ammam et al., 2013; Brandi et al., 2020; Depardieu et al., 2003; Erol et al., 2006; Hirakawa et al., 2008; Huang et al., 2018; Masuda and Church, 2002; McKessar et al., 2000; Nishino et al., 2003; Nishino and Yamaguchi, 2004, 2002; Ovchinnikov et al., 2018; Samantha and Vrielink, 2020; Yelin et al., 1999). Estos ARGs podrían estar jugando un papel clave en la aparición de las diversas respuestas de la RAM observadas para meropenem en este trabajo.

Además, resaltamos la importancia de la presencia constante de **H-NS** en los tres antibióticos, ya que es una proteína similar a las histonas, crucial para el nucleóide bacteriano (Nishino and Yamaguchi, 2004). Esta proteína está altamente relacionada con la regulación genética en bacterias Gram negativas. Se ha reportado que más de 60 genes interactúan con **H-NS**, la mayoría relacionados con el metabolismo, la tolerancia al estrés y la aparición de resistencia a múltiples antibióticos (Erol et al., 2006; Nishino and Yamaguchi, 2004).

Las muestras expuestas a gentamicina y florfenicol mantuvieron el número de ARGs a lo largo de todo el desafío. Gentamicina presentó 37 genes únicos, mientras que florfenicol reportó un total de 44 ARGs. En el caso de gentamicina, se observó variación en la presencia de los genes *E. coli* UhpT y el gen *mdtF*. El gen *E. coli* UhpT, está relacionado con la expresión del sistema de transporte de fosfato de azúcar y está regulado por glucosa 6-fosfato externa mediante tres genes reguladores vinculados a uhpABC, principalmente relacionados con la resistencia a fosfomicina (Garallah and Al-Jubori, 2020; Island et al., 1992). El gen *MdtF* codifica para un transportador de membrana interna involucrado en el eflujo, mediante el complejo MdtEF-TolC, (Nishino et al., 2008) de diversos compuestos tóxicos, incluidos antibióticos (Elkins and Nikaido, 2003).

En el caso de florfenicol, no hubo diferencias en el número de ARGs, aunque se mencionan mutaciones genéticas que disminuyeron la susceptibilidad al antibiótico, posiblemente causadas por el estrés relacionado con la expresión de los ARGs (Kerek et al., 2024).

La RAM en microorganismos ha sido evaluada principalmente mediante el crecimiento en monocultivos y la medición de la MIC mediante microdiluciones o antibiogramas (Andrews, 2001, 2001). No obstante, en las últimas décadas, se ha reconocido la importancia de otros factores como la densidad poblacional, el crecimiento en biopelículas, las concentraciones sub-MIC de antibióticos y la tolerancia en el aumento de las mutaciones y la tasa evolutiva de la RAM (Gullberg et al., 2011; Levin-Reisman et al., 2019, 2017; Macia et al., 2014; Olson et al., 2002; Yu et al., 2018). Además, las interacciones entre comunidades microbianas y su nicho ecológico también influyen en la aparición de RAM. El sistema MEGA-plate, ofrece una ventaja sobre otros estudios evolutivos al permitir observar la evolución de la RAM en concentraciones altas de antibióticos y la aparición de linajes que muestran diferentes estrategias para resistir en un contexto evolutivo de espacio y tiempo.

Se ha demostrado que los ARGs, pueden propagarse en diferentes medios ambientales, aumentando la posibilidad de que surjan microorganismos resistentes, lo cual representa un riesgo para la salud pública

(Chen et al., 2022). Por ejemplo, se ha estudiado ampliamente la contaminación por ARGs en hospitales, (Alexander et al., 2022; Chen et al., 2022; Hanafiah et al., 2024; Ma et al., 2022; Perry et al., 2021; Rowe et al., 2017; Talat et al., 2023; Wu et al., 2022; Zhang et al., 2022) y han sido identificados como una fuente principal de ARGs y de bacterias resistentes (Chen et al., 2022). Por lo tanto, detectar la presencia de ARGs en bacterias potencialmente resistentes podría ser clave para una detección temprana de la RAM. Un estudio determinó que la asociación entre especies abundantes y la presencia de los ARGs en muestras de hospitales, tiene una conexión entre las especies de microorganismos y los ARGs encontrados. Por lo tanto, es importante considerar las características particulares de la especie microbiana, así como las de los antibióticos a los cuales se están exponiendo (Chen et al., 2022). Esto no es unidireccional, sino que depende de cientos de variaciones que pueden estar contribuyendo a que la bacteria active determinada estrategia que le permita continuar creciendo en presencia de antibióticos. Esto se pudo determinar por la variación de los ARGs que presentó la bacteria *E. coli* al desafío con el antibiótico meropenem, así como los cambios morfológicos encontrados para el mismo, aunado a la estabilidad en la presencia de genes con los antibióticos gentamicina y florfenicol, lo cual es un indicador de que la bacteria es capaz de montar diferentes respuestas dependiendo del mecanismo de acción del antibiótico al cual fue expuesta.

Una estrategia que ya se ha descrito y que favorece la aparición de la RAM es mediante la respuesta al sistema SOS. Bos et al. (2015) analizaron la evolución de la bacteria *E. coli* con el antibiótico ciprofloxacino y demostraron que la bacteria cambia su forma de bastón por una forma filamentosa que presenta múltiples cromosomas. En concentraciones inhibitorias mínimas, la bacteria filamentosa presenta una división asimétrica en la punta formando brotes que contienen estos cromosomas y si resultan en un fenotipo resistente, la bacteria se propaga con un linaje no filamentoso y este linaje presenta mayor resistencia al antibiótico expuesto. Ellos propusieron que esta morfología filamentosa multinucleada, es una estrategia que permite la continuación de los siguientes linajes que son mutantes mejorados debido a la respuesta del sistema SOS. En nuestro trabajo, encontramos la presencia de la morfología filamentosa con el desafío del antibiótico meropenem. En las muestras M1, esta morfología comienza a formarse, aunque no está bien definida, sobre todo en aquellas muestras que se tomaron cerca del carril 2, donde comienza el desafío con el antibiótico. Estos cambios que presentó la bacteria en el carril 1, nos dan un claro indicador de cómo la bacteria se prepara para pasar al carril que ya cuenta con antibiótico para continuar con su replicación. Las muestras tomadas del carril M2 ya muestran la formación de esta morfología filamentosa, lo que nos permite inferir que es una de las primeras respuestas que presenta la bacteria a la exposición de antibióticos. No obstante, las cepas que fueron desafiadas con el antibiótico gentamicina y en combinación con

meropenem, mostraron la morfología filamentosa a partir de carril 2 y no todas las bacterias presentaron este cambio como ocurrió con el antibiótico meropenem. Por otro lado, diversos estudios han reportado los efectos que provocan los antibióticos en el crecimiento bacteriano (Bos et al., 2015; Cross et al., 2019; Martínez, 2017; Muhamad Hendri et al., 2024; Ponmalar et al., 2022). No obstante, no se tenía presente todas las estructuras reportadas en un solo sistema como en el caso de la MEGA-plate. En el trabajo realizado por Muhamad Hendri et al. (2024), se describieron las alteraciones morfológicas y estructurales en la pared celular, la membrana plasmática, la densidad citoplasmática y en la síntesis de proteínas, encontrando morfologías irregulares similares a las que encontramos en las muestras M3 y la morfología filamentosa. No obstante, no encontraron la morfología circular. Cross et al. (2019) demostraron que la tolerancia a los β -lactámicos, incluido el antibiótico meropenem, podía estar mediada por esferoplastos, aunque no los encontraron presentes en el caso de la bacteria *E. coli*. Sin embargo, encontraron la formación de una morfología circular, la misma que nosotros encontramos en el carril M5 con meropenem y en los carriles 2 y 3 del desafío con los antibióticos combinados. En su estudio mencionan que, después de 6 horas de exposición al antibiótico, la bacteria *E. coli* no presenta esta morfología y solo encontraron restos celulares. Por otro lado, en nuestro trabajo logramos el crecimiento de la bacteria, aunque la morfología no correspondía a la formación de esferoplastos, lo cual es un indicador de la

presencia de otra estrategia que aún no ha sido descrita y que suele darse cuando la bacteria está en condiciones de mayor estrés, como en este caso, al ser expuesta a concentraciones altas del antibiótico. Con el antibiótico gentamicina, la bacteria presentó cambios a nivel fenotípico, pero no en el número de ARGs encontrados a lo largo de los 5 carriles. Sin embargo, varios mecanismos de resistencia han sido reportados para los aminoglucósidos que no involucran cambios en su morfología, tales como: la modificación enzimática e inactivación de los aminoglucósidos, bombas de eflujo, disminución en la permeabilidad bacteriana, así como las modificaciones de la subunidad ribosómica 30S que alteran la unión de los aminoglucósidos (Doi et al., 2016).

Aunque hace relativamente poco que se empezó a determinar lo que es el resistoma, ha sido un concepto que ha tomado gran importancia desde sus comienzos (D'Costa et al., 2006; Kim and Cha, 2021). Aquí tomamos la definición de Kim and Cha (2021) para el resistoma antibiótico, el cual abarca los diferentes ARGs de forma intrínseca y adquirida, así como los precursores y los mecanismos de resistencia dentro de comunidades microbianas que requieren de cambios en un contexto evolutivo para adquirir RAM. Nosotros pudimos establecer el resistoma antibiótico para meropenem y gentamicina mediante el desafío evolutivo de la MEGA-plate en la bacteria *E. coli*, y lo comparamos con los datos obtenidos con Kerek et al. (2024) con el antibiótico florfenicol. Encontramos un grupo de 22 ARGs que comparten los 3

antibióticos que pueden estar jugando un papel importante en la aparición de la RAM en diferentes familias de antibióticos.

Nuestro trabajo permitió identificar, en un contexto evolutivo, las diversas estrategias que presenta la bacteria *E. coli* para resistir a concentraciones altas en dos familias de antibióticos. Si bien el sistema de la MEGA-plate no iguala las condiciones en los sectores clínicos y ambientales a los cuales los microorganismos están expuestos diariamente, nos permite tener un panorama más claro en términos de las diversas estrategias que desarrollan las bacterias en respuesta a la exposición constante de antibióticos, ya que los microorganismos tienen una fuerte capacidad de adaptación que les permite activar varios mecanismos y estrategias para sobrevivir a la exposición constante de antibióticos. No solo hay cambios en los ARGs, como en el caso de meropenem, sino que también presentan una plasticidad fenotípica y genotípica dependiendo del antibiótico y de las condiciones intrínsecas y extrínsecas a las cuales las bacterias están siendo desafiadas.

El poder comparar los antibióticos gentamicina y meropenem, con el antibiótico florfenicol que es de uso veterinario y encontrar este grupo compartido de 22 ARGs, nos brinda la oportunidad incluir en nuestro análisis una perspectiva integradora debido a que los ARGs se encuentran presentes en humanos, animales y en el medio ambiente en general, por lo que ha sido un tema relevante en las últimas décadas (Salud, 2017). Los antibióticos que

son de uso veterinario están asociados con la expansión del resistoma en animales y por ende, tienen una fuerte correlación en la transferencia a humanos (Kim and Cha, 2021), por lo que no debemos intentar estudiarlos por separado, sino que se deben incluir en análisis sistemáticos, todos los posibles factores que pudieran estar contribuyendo al problema de la aparición de la RAM, así como integrar antibióticos de uso veterinario.

Funciones biológicas

De los 5 grupos funcionales que se determinaron para los antibióticos gentamicina y meropenem, en particular nos pareció interesante el grupo de las funciones relacionadas con la regulación positiva de la expresión genética que abarca 10 funciones biológicas y están relacionadas específicamente con tres genes; *baeR*, *gadX* y *marA*. Esta función también se encontró presente con el antibiótico florfenicol. Se ha demostrado que el sistema de dos componentes BaeSR tiene relevancia en la resistencia a diversos antibióticos (Baranova and Nikaido, 2002; Nagakubo et al., 2002). Específicamente el regulador *baeR* modula la expresión de *mdtABC* y *acrD*, para bombas de eflujo múltiples (Hirakawa et al., 2003), confiriendo resistencia contra β -lactámicos, novobiocina, dodecil sulfato de sodio y sales biliares (Baranova and Nikaido, 2002; Nagakubo et al., 2002; Nishino et al., 2005). No obstante, se sabe que más de 50 genes son activados por *baeR* afectando diversas funciones como la expresión de grupos de genes relacionados con la transducción de señales

de dos componentes, el transporte de maltosa, las respuestas quimiotáticas, la biosíntesis flagelar y el transporte de múltiples fármacos (Nishino et al., 2005). Como se demostró con nuestros resultados el gen *baeR*, está relacionado con múltiples funciones relacionadas a la regulación positiva y biosíntesis en diversos procesos. Por otro lado, varios estudios han demostrado que el gen *gadX* está relacionado con reguladores transcripcionales relacionados con funciones involucradas en el catabolismo de azúcares, la respuesta al estrés y la virulencia (Gallegos et al., 1997; Martin and Rosner, 2001; Tramonti et al., 2002). También se ha demostrado que el gen *marA* presenta una interconexión con funciones reguladoras relacionadas con el metabolismo, cambios en la expresión génica, respuesta a diversas condiciones de estrés y el metabolismo celular, además de tener una gran relevancia en la aparición de la multirresistencia (Martin and Rosner, 2001; Ruiz and Levy, 2010; Schneiders et al., 2004). Es por ello que estos genes tienen un alto impacto en diversas funciones importantes en la regulación bacteriana y, además, están directamente relacionados con la RAM.

A diferencia de los antibióticos gentamicina y meropenem, el antibiótico florfenicol presentó 7 grupos funcionales. Una de las funciones más relevantes es la que está relacionada con el proceso catabólico de metilgloxal a D-lactato a través de S-lactoil-glutathión, que se encuentra directamente relacionado con el metabolito metilgloxal que es un subproducto de varias reacciones metabólicas como la glucólisis, la peroxidación lipídica, la degradación de

proteínas y la fotosíntesis (Jain et al., 2018). Este metabolito es producido por todos los organismos incluyendo bacterias y levaduras, también se ha relacionado con la respuesta a estrés en concentraciones bajas. No obstante, cuando aumenta su concentración provoca efectos negativos en la célula y es necesario que se realice un proceso de desintoxicación para evitar daños mayores (Jain et al., 2018). Se sabe que la vía de la glioxalasa es el principal sistema para realizar este proceso (Misra et al., 1995; Thornalley, 1990). Esta vía se compone principalmente de dos enzimas, la glioxalasa I (GLYI), que convierte la enzima metilglioxal en SD-lactoilglutación (SLG), y la glioxalasa II (GLYII), que convierte SLG en D-lactato. Por otro lado, se ha demostrado que la enzima, la D-lactato deshidrogenasa (D-LDH) también está involucrada en el proceso de desintoxicación del metilglioxal (Misra et al., 1995; Thornalley, 1990). Los ARGs encontrados con el desafío florfenicol que están relacionados con este proceso son: *gadW*, *gadX*, *marA*. Particularmente los genes *gadW* y *gadX* están asociados con respuestas al ácido y su función en la resistencia se basa en el regulador GadW que pertenece a la familia AraC, este promueve la expresión de *mdtEF* y les confiere resistencia a múltiples fármacos (Tucker et al., 2003).

La función del proceso metabólico de los lipopolisacáridos se presentó únicamente para los ARGs asociados al antibiótico florfenicol. Se sabe que la alteración en la biosíntesis de los lipopolisacáridos, especialmente en bacterias Gram negativas, suele generar un fenotipo rugoso (Seregina et al.,

2022). Esto es interesante en relación con los cambios morfológicos observados con meropenem, lo que nos hizo esperar la presencia de funciones vinculadas a la biosíntesis de esta molécula, aunque no lo encontramos para este desafío. El fenotipo rugoso, producto de la alteración en la biosíntesis de los lipopolisacáridos, provoca mayor sensibilidad a compuestos hidrófobos y antibióticos como la novobiocina, actinomicina D y eritromicina, entre otros (Seregina et al., 2022). Se ha demostrado que las bacterias con deleciones en los genes ADP-heptosa, implicados en la síntesis de lipopolisacáridos, son hipersensibles a antibióticos como aminoglucósidos, β -lactámicos y algunos inhibidores de la ARN polimerasa (Seregina et al., 2022). En nuestros análisis se determinó que los genes que están relacionados con este proceso en el desafío con el antibiótico florfenicol son los ARGs: *arnC*, *eptA*, *ugd*. Se sabe que el operón *arn* (*arnBCADTEF*) está ampliamente conservado en bacterias Gram negativas (Baron et al., 2018; Cheung et al., 2020; Gunn et al., 2000; Jiang et al., 2010; Liang et al., 2023; Lin et al., 2014; McPhee et al., 2003). Los productos de este operón se encargan de la biosíntesis de 4-amino-4-desoxi- L- arabinosa (L-Ara4N) y la transferencia de L-Ara4N a la fracción de lípido A del lipopolisacárido en bacterias Gram negativas (Gunn et al., 2000; Poirel et al., 2017). Se sabe que el sistema modificado del lipopolisacárido Arn es un importante mecanismo de resistencia en bacterias (Gunn et al., 2000; Poirel et al., 2017). El gen *eptA* ha sido ampliamente estudiado en diversos patógenos debido a que confiere

resistencia al antibiótico polimixina. Este gen es el encargado catalizar la adición de una fracción de fosfoetanolamina al lípido A. La modificación de fosfoetanolamina, modifica la carga negativa de la membrana externa en bacterias Gram negativas y esto hace que las bacterias sean resistentes al antibiótico polimixina (Freire et al., 2021; Samantha and Vrielink, 2020). Por otro lado, el gen *ugd*, produce la UDP-glucosa deshidrogenasa (Ugd) que genera el ácido UDP-glucurónico y es considerado un precursor importante para algunas glicoestructuras en la superficie bacteriana (Mainprize et al., 2013). Particularmente este proceso se ha estudiado en la bacteria *E. coli K-12*, ya que su participación está relacionada con la síntesis del ácido colánico que también es necesario en la producción de polisacáridos capsulares que son importantes en la virulencia de *E. coli K-12* (Mainprize et al., 2013).

Aunque varias funciones de los ARGs presentes en florfenicol no se comparten con los antibióticos meropenem y gentamicina, encontramos cuatro funciones biológicas relacionadas con los 22 genes que comparten los tres antibióticos. Esto es relevante porque estudios futuros podrían centrarse en identificar nuevas dianas, no solo a nivel de los ARGs, sino también en las funciones biológicas que describimos para combatir la resistencia a los antimicrobianos.

Finalmente, no todos los ARGs identificados en este estudio se relacionaron con funciones biológicas específicas, lo que sugiere que futuros análisis deberían enfocarse en elucidar su papel en las funciones celulares, más allá de la resistencia. Mantener y expresar los ARGs implica un costo para las bacterias, lo que sugiere que su función podría ir más allá de proporcionar resistencia (Lai and Cooper, 2024).

Este estudio ofrece una visión amplia de la RAM desde una perspectiva evolutiva, demostrando las diversas estrategias que las bacterias desarrollan para resistir a los antibióticos. Sin embargo, quedan aspectos por integrar, como la transferencia horizontal de genes mediante plásmidos y las mutaciones compensatorias que permiten a las bacterias mantener su aptitud sin dejar de replicarse (Bottery et al., 2021; Redondo-Salvo et al., 2020). Estos factores deben considerarse en estudios futuros sin perder de vista el enfoque evolutivo. Además se demostró que las terapias combinadas de los antibióticos carbapenémicos y aminoglucósidos son una buena opción para contrarrestar la RAM y la MDR (Terbtothakun et al., 2021).

CAPÍTULO 7

8. Conclusión

Estudiar la RAM desde una perspectiva evolutiva utilizando el sistema MEGA-plate, nos permitió observar que los microorganismos son capaces de montar diversas respuestas para sobrevivir a la exposición a antibióticos. Estas respuestas se activan por múltiples factores a los cuales el microorganismo está expuesto. En este trabajo encontramos el resistoma que presenta la bacteria *E. coli* para responder a los antibióticos meropenem con 57 ARGs y gentamicina con 37 ARGs, además se realizó la comparación de los 44 ARGs reportados con el antibiótico florfenicol que es de uso veterinario. Por otro lado, se determinó la presencia de 22 ARGs que se encontraron presentes en los 3 antibióticos que pueden ser dianas para tratamientos futuros.

Se encontraron cambios a nivel morfológico en los tres desafíos. No obstante, las cepas desafiadas con el antibiótico meropenem mostraron mayor variación a nivel morfológico y en la presencia de los ARGs a lo largo de todo el desafío. Esto es un claro indicador de que la respuesta de la bacteria a la exposición de los antibióticos depende del mecanismo de acción del antibiótico al cual fue expuesta, demostrando que los microorganismos presentan una gran plasticidad tanto fenotípica como genotípica que les permite adaptarse y adquirir RAM y MDR. Por otro lado, se demostró la eficacia de las terapias combinadas con los antibióticos carbapenémicos y aminoglucósidos, ya que

la bacteria no logró crecer hasta los últimos carriles que contenían una mayor concentración de los antibióticos combinados, por lo que son una buena opción para el tratamiento de microorganismos resistentes y multirresistentes. Aunado a esto, se demostró la importancia que presentan los ARGs no sólo en la adquisición de la RAM, sino que también que están relacionados con funciones biológicas importantes para el funcionamiento de la bacteria *E. coli*. Lo cual resalta la importancia de que la RAM es un problema complejo que abarca cientos de factores intrínsecos y extrínsecos que contribuyen en la aparición de esta. Por consiguiente, este trabajo contribuyó en ampliar la perspectiva del estudio de la RAM desde un contexto evolutivo el cual debe ser considerado en los estudios futuros que se realicen para combatir este problema.

ANEXO I

Aro Term: Meropenem	SNP	Familia de genes de AMR	Clase de fármaco	Mecanismo de resistencia	Matching	Longitud
acrB		Bomba de expulsión de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, gliciliciclina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	99.9	100
acrD		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico aminoglucósido	Flujo de antibióticos	99.9	100
AcrE		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, cefamicina, penam	Flujo de antibióticos	100	100
AcrF		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, cefamicina, penam	Flujo de antibióticos	99.61	100
AcrS		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, gliciliciclina, cefamicina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	99.09	100
adeF		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, antibiótico de tetraciclina	Flujo de antibióticos	41.62	97.92
ArnT		PMR fosfoetanolamina transferasa	Antibiótico peptídico	Alteración de la diana antibiótica	63.7	99.82

bacA		Proteínas relacionadas con el pirofosfato de undecaprenil	Antibiótico peptídico	Alteración de la diana antibiótica	99.63	100
baeR		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico aminoglucósido, antibiótico aminocumarina	Flujo de antibióticos	96.23	100
cpxA		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico aminoglucósido, antibiótico aminocumarina	Flujo de antibióticos	100	100
CRP		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam	Flujo de antibióticos	99.52	100
EC-13		Betalactamasas EC	Cefalosporina	Inactivación de antibióticos	98.67	100
emrA		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico fluoroquinolona	Flujo de antibióticos	99.74	100
emrB		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico fluoroquinolona	Flujo de antibióticos	100	110.26
emrK		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico de tetraciclina	Flujo de antibióticos	100	110.26

emrR		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico fluoroquinolona	Flujo de antibióticos	100	100
emrY		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico de tetraciclina	Flujo de antibióticos	100	100
eptA		PMR fosfoetanolamina transferasa	Antibiótico peptídico	Alteración de la diana antibiótica	99.63	100
<i>Escherichia coli</i> acrA		Resistencia-nodulación-división celular (RND) bomba de eflujo de antibióticos	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, gliciliciclina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	100	100
<i>Escherichia coli</i> AcrAB-TolC con mutación AcrR que confiere resistencia a ciprofloxacino, tetraciclina y ceftazidima		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, gliciliciclina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, agentes desinfectantes y antisépticos	alteración de la diana antibiótica, eflujo de antibióticos	100	100
<i>Escherichia coli</i> AcrAB-TolC con mutaciones en MarR que confieren resistencia a ciprofloxacino y tetraciclina	Y137H, G103S	Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, gliciliciclina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, agentes desinfectantes y antisépticos	alteración de la diana antibiótica, eflujo de antibióticos	98.14	100

<i>Escherichia coli</i> ampC betalactamasa		Betalactamasas de tipo ampC	Cefalosporina, penam	Inactivación de antibióticos	98.14	100
<i>Escherichia coli</i> EF- Tu mutantes que confieren resistencia a la pulvomicina	R234F	EF-Tu resistente a la elfamicina	Antibiótico elfamicina	Alteración de la diana antibiótica	99.75	96.33
<i>Escherichia coli</i> emrE		Pequeña bomba de eflujo de antibióticos para resistencia múltiple (SMR)	Antibiótico macrólido	Flujo de antibióticos	99.09	100
<i>Escherichia coli</i> GlpT con mutación que confiere resistencia a la fosfomicina	E448K	GlpT resistente a los antibióticos	Antibiótico de ácido fosfónico	Alteración de la diana antibiótica	99.56	100
<i>Escherichia coli</i> mdfA		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico de tetraciclina, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	97.07	100
<i>Escherichia coli</i> soxR con mutación que confiere resistencia a los antibióticos		Bomba de eflujo de antibióticos en casete de unión a ATP (ABC), bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS), bomba de eflujo de antibióticos de división celular de resistencia-nodulación (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, gliciliciclina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, agentes desinfectantes y antisépticos	alteración de la diana antibiótica, eflujo de antibióticos	100	100

<i>Escherichia coli</i> soxS con mutación que confiere resistencia a los antibióticos		Bomba de eflujo de antibióticos en casete de unión a ATP (ABC), bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS), bomba de eflujo de antibióticos de división celular de resistencia-nodulación (RND), porina bacteriana general con permeabilidad reducida a los betalactámicos	Antibiótico fluoroquinolona, monobactam, carbapenémico, cefalosporina, glicilclina, cefamicina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, penem, agentes desinfectantes y antisépticos	alteración de la diana antibiótica, flujo de antibióticos, reducción de la permeabili dad al antibiótico	100	100
<i>Escherichia coli</i> UhpT con mutación que confiere resistencia a la fosfomicina	E350Q	UhpT resistente a los antibióticos	Antibiótico de ácido fosfónico	Alteración de la diana antibiótica	95.25	100
evgA		Facilitador principal bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia (MFS), bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam, antibiótico tetraciclina	Flujo de antibióticos	100	100
evgS		Facilitador principal bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia (MFS), bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam, antibiótico tetraciclina	Flujo de antibióticos	99.25	100
gadX		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación- división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam	Flujo de antibióticos	98.54	100

<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3 que confiere resistencia a los antibióticos betalactámicos	D350N, S357N	Mutaciones en proteínas de unión a la penicilina que confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos	Cefalosporina, cefamicina, penam	Alteración de la diana antibiótica	53.11	96.39
H-NS		Facilitador principal bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia (MFS), bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, cefamicina, penam, antibiótico de tetraciclina	Flujo de antibióticos	100	100
kdpE		kdpDE	Antibiótico aminoglucósido	Flujo de antibióticos	99.56	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnE		Pequeña bomba de eflujo de antibióticos para resistencia múltiple (SMR)	Antibiótico macrólido, antibiótico aminoglucósido, cefalosporina, antibiótico tetraciclina, antibiótico peptídico, antibiótico rifamicina, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	82.2	100.83
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF		Pequeña bomba de eflujo de antibióticos para resistencia múltiple (SMR)	Antibiótico macrólido, antibiótico aminoglucósido, cefalosporina, antibiótico tetraciclina, antibiótico peptídico, antibiótico rifamicina, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	84.4	100
leuO		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico nucleósido, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	99.04	100
marA		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND), Porina bacteriana general con reducción	Antibiótico fluoroquinolona, monobactam, carbapenémico, cefalosporina, gliciliciclina, cefamicina, penam, antibiótico tetraciclina,	Flujo de antibióticos reducido permeabilidad	100	100

		de la permeabilidad a los betalactámicos	Antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, penem, agentes desinfectantes y antisépticos	ad al antibiótico		
mdtA		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico aminocumarina	Flujo de antibióticos	99.52	100
mdtB		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico aminocumarina	Flujo de antibióticos	99.52	100
mdtC		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico aminocumarina	Flujo de antibióticos	99.71	100
mdtE		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam	Flujo de antibióticos	100	100
mdtF		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam	Flujo de antibióticos	99.81	100
mdtG		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico de ácido fosfónico	Flujo de antibióticos	100	100
mdtH		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico fluoroquinolona	Flujo de antibióticos	99.75	100

mdtM		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico fluoroquinolona, antibiótico lincosamida, antibiótico nucleósido, antibiótico fenicol, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	97.56	100
mdtN		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico nucleósido, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	99.71	100
mdtO		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico nucleósido, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	99.41	100
mdtP		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico nucleósido, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	98.16	100
msbA		Bomba de eflujo de antibióticos en casete de unión a ATP (ABC)	Antibiótico nitroimidazol	Flujo de antibióticos	100	100
PmrF		PMR fosfoetanolamina transferasa	Antibiótico peptídico	Alteración de la diana antibiótica	99.69	100
qacJ		Pequeña bomba de eflujo de antibióticos para resistencia múltiple (SMR)	Agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	46.58	70.09
rsmA		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, antibiótico diaminopirimidina, antibiótico fenicol	Flujo de antibióticos	85.25	100

ToIC		Bomba de eflujo de antibióticos en casete de unión a ATP (ABC), bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS), bomba de eflujo de antibióticos de división celular de resistencia-nodulación (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, antibiótico aminoglucósido, carbapenémico, cefalosporina, glicilciclina, cefamicina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico peptídico, antibiótico aminocumarina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, penem, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	100	99.6
vanG		Grupo de genes de resistencia a glicopéptidos, Van ligasa	Antibiótico glicopéptido	Alteración de la diana antibiótica	38.23	104.3
YojI		Bomba de eflujo de antibióticos en casete de unión a ATP (ABC)	Antibiótico peptídico	Flujo de antibióticos	99.82	100

Aro Term: Gentamicina	SNP	Familia de genes de AMR	Clase de fármaco	Mecanismo de resistencia	Matching	Longitud
AcrS		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, glicilciclina, cefamicina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	100	100
ACT-17		ACT betalactamasa	Carbapenémico, cefalosporina, cefamicina, penam	Inactivación de antibióticos	100	100
adeF		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, antibiótico de tetraciclina	Flujo de antibióticos	41.45	97.92
ArnT		PMR fosfoetanolamina transferasa	Antibiótico peptídico	Alteración de la diana antibiótica	63.52	99.82
baeR		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico aminoglucósido, antibiótico aminocumarina	Flujo de antibióticos	97.92	100
baeS		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico aminoglucósido, antibiótico aminocumarina	Flujo de antibióticos	93.15	100
CRP		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam	Flujo de antibióticos	99.05	100
emrB		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico fluoroquinolona	Flujo de antibióticos	93.79	120.7

emrK		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico de tetraciclina	Flujo de antibióticos	100	110.26
emrR		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico fluoroquinolona	Flujo de antibióticos	94.86	100
emrY		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico de tetraciclina	Flujo de antibióticos	99.61	100
eptA		PMR fosfoetanolamina transferasa	Antibiótico peptídico	Alteración de la diana antibiótica	99.63	100
Escherichia coli AcrAB-TolC with MarR mutations conferring resistance to ciprofloxacin and tetracycline		Resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, gliciliciclina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, agentes desinfectantes y antisépticos	alteración de la diana antibiótica, eflujo de antibióticos	90.28	100
Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin	R234F	EF-Tu resistente a la elfamicina	Antibiótico elfamicina	Alteración de la diana antibiótica	98.73	96.33
Escherichia coli emrE		Pequeña bomba de eflujo de antibióticos para resistencia múltiple (SMR)	Antibiótico macrólido	Flujo de antibióticos	99.09	100

Escherichia coli UhpT con mutación que confiere resistencia a la fosfomicina	E350Q	UhpT resistente a los antibióticos	Antibiótico de ácido fosfónico	Alteración de la diana antibiótica	95.25	100
evgA		Facilitador principal bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia (MFS), bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam, antibiótico tetraciclina	Flujo de antibióticos	100	100
evgS		Facilitador principal bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia (MFS), bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam, antibiótico tetraciclina	Flujo de antibióticos	99.08	100
gadX		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam	Flujo de antibióticos	98.54	100
Haemophilus influenzae PBP3 que confiere resistencia a los antibióticos betalactámicos	D350N, S357N	Mutaciones en proteínas de unión a la penicilina que confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos	Cefalosporina, cefamicina, penam	Alteración de la diana antibiótica	52.57	96.39
H-NS		Facilitador principal bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia (MFS), bomba de eflujo de antibióticos de	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, cefamicina, penam, antibiótico de tetraciclina	Flujo de antibióticos	94.12	100

		resistencia-nodulación-división celular (RND)				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnE		Pequeña bomba de eflujo de antibióticos para resistencia múltiple (SMR)	Antibiótico macrólido, antibiótico aminoglucósido, cefalosporina, antibiótico tetraciclina, antibiótico peptídico, antibiótico rifamicina, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	84.17	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF		Pequeña bomba de eflujo de antibióticos para resistencia múltiple (SMR)	Antibiótico macrólido, antibiótico aminoglucósido, cefalosporina, antibiótico tetraciclina, antibiótico peptídico, antibiótico rifamicina, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	88.07	100
leuO		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico nucleósido, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	82.17	100
marA		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND), porina bacteriana general con permeabilidad reducida a los betalactámicos	Antibiótico fluoroquinolona, monobactam, carbapenémico, cefalosporina, gliciliciclina, cefamicina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, penem, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos, permeabilidad reducida al antibiótico	94.35	99.21
mdtE		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam	Flujo de antibióticos	100	100
mdtF		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico macrólido, antibiótico fluoroquinolona, penam	Flujo de antibióticos	99.81	100

mdtM		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico fluoroquinolona, antibiótico lincosamida, antibiótico nucleósido, antibiótico fenicol, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	97.8	100
mdtN		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico nucleósido, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	100	100
mdtO		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico nucleósido, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	99.41	100
mdtP		Bomba de eflujo de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	Antibiótico nucleósido, desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	98.57	100
msbA		Bomba de eflujo de antibióticos en casete de unión a ATP (ABC)	Antibiótico nitroimidazol	Flujo de antibióticos	94.67	100
PmrF		PMR fosfoetanolamina transferasa	Antibiótico peptídico	Alteración de la diana antibiótica	100	100
qacJ		Pequeña bomba de eflujo de antibióticos para resistencia múltiple (SMR)	Agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	46.58	70.09
rsmA		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, antibiótico diaminopirimidina, antibiótico fenicol	Flujo de antibióticos	85.25	100

<i>Shigella flexneri</i> <i>acrA</i>		Bomba de eflujo de antibióticos de resistencia-nodulación-división celular (RND)	Antibiótico fluoroquinolona, cefalosporina, glicilciclina, penam, antibiótico tetraciclina, antibiótico rifamicina, antibiótico fenicol, agentes desinfectantes y antisépticos	Flujo de antibióticos	85.89	100
<i>vanG</i>		Grupo de genes de resistencia a glicopéptidos, Van ligasa	Antibiótico glicopéptido	Alteración de la diana antibiótica	39.2	105.44

ANEXO II

ID Meropenem	Descripción	Grupoos	Genes asociados encontrados
GO:0046677	Respuesta al antibiótico	Grupo1	acrB, bacA, emrA, emrB, emrK, emrY, eptA, marA, mdtE, mdtF, mdtG, mdtH, mdtM, mdtN, mdtO, mdtP, mprA, rsmA
GO:0007165	Transducción	Grupo2	baeR, cpxA, evgA, evgS, kdpE
GO:0035556	Transducción de señales intracelulares	Grupo2	baeR, cpxA, evgA, evgS, kdpE
GO:0000160	Sistema de transducción de señal de fosforesforé	Grupo2	baeR, cpxA, evgA, evgS, kdpE
GO:0042493	Respuesta a la droga	Grupo3	acrB, acrD, baeR, emrA, emrK, mdtC, mdtE, mdtF, mdtG, mdtM, mdtN
GO:0015893	Transporte de drogas	Grupo3	acrB, acrD, emrA, emrK, mdtC, mdtE, mdtF, mdtG, mdtM, mdtN
GO:0006855	Transporte transmembrana de fármacos	Grupo3	acrB, acrD, emrA, emrK, mdtE, mdtF, mdtG, mdtM, mdtN
GO:0046618	Exportación de medicamentos	Grupo3	acrB, acrD, mdtC, mdtM
GO:0072348	Transporte de compuestos de azufre	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:0042886	Transporte de amida	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:0045117	Transporte de azoles	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:0015906	Transporte de sulfatiazol	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:1902599	Transporte transmembrana de sulfatiazol	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:0009891	Regulación positiva del proceso biosintético	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0051173	Regulación positiva del proceso metabólico de los compuestos nitrogenados	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0010557	Regulación positiva del proceso biosintético de macromoléculas	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0010628	Regulación positiva de la expresión génica	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0031328	Regulación positiva del proceso biosintético celular	Grupo5	baeR, gadX, marA

GO:0045935	Regulación positiva del proceso metabólico compuesto que contiene nucleobases	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0051254	Regulación positiva del proceso metabólico del ARN	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:1902680	Regulación positiva del proceso biosintético de ARN	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0045893	Regulación positiva de la transcripción, con plantilla de ADN	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:1903508	Regulación positiva de la transcripción con plantilla de ácidos nucleicos	Grupo5	baeR, gadX, marA

ID Gentamicina	Descripción	Grupos	Associated Genes Found
GO:0046677	Respuesta al antibiótico	Grupo1	emrB, emrK, emrY, eptA, marA, mdtE, mdtF, mdtM, mdtN, mdtO, mdtP, mprA, rsmA
GO:0042493	Respuesta a la droga	Grupo2	baeR, emrK, mdtE, mdtF, mdtM, mdtN
GO:0015893	Transporte de drogas	Grupo2	emrK, mdtE, mdtF, mdtM, mdtN
GO:0006855	Transporte transmembrana de fármacos	Grupo2	emrK, mdtE, mdtF, mdtM, mdtN
GO:0007165	Transducción	Grupo3	baeR, baeS, evgA, evgS
GO:0035556	Transducción de señales intracelulares	Grupo3	baeR, baeS, evgA, evgS
GO:0000160	Sistema de transducción de señal de fosforesforé	Grupo3	baeR, baeS, evgA, evgS
GO:0072348	Transporte de compuestos de azufre	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:0042886	Transporte de amida	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:0045117	Transporte de azoles	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:0015906	Transporte de sulfatiazol	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:1902599	Transporte transmembrana de sulfatiazol	Grupo4	mdtN, mdtO, mdtP
GO:0009891	Regulación positiva del proceso biosintético	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0051173	Regulación positiva del proceso metabólico de los compuestos nitrogenados	Grupo5	baeR, gadX, marA

GO:0010557	Regulación positiva del proceso biosintético de macromoléculas	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0010628	Regulación positiva de la expresión génica	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0031328	Regulación positiva del proceso biosintético celular	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0045935	Regulación positiva del proceso metabólico compuesto que contiene nucleobases	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0051254	Regulación positiva del proceso metabólico del ARN	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:1902680	Regulación positiva del proceso biosintético de ARN	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:0045893	Regulación positiva de la transcripción, con plantilla de ADN	Grupo5	baeR, gadX, marA
GO:1903508	Regulación positiva de la transcripción con plantilla de ácidos nucleicos	Grupo5	baeR, gadX, marA

ID Florfenicol	Descripción	Grupos	Genes asociados encontrados
GO:0046618	Exportación de medicamentos	Grupo1	[acrB, acrD, mdtC, mdtM]
GO:0046677	Respuesta al antibiótico	Grupo2	[acrB, acrE, arnC, bacA, emrA, emrB, emrK, emrY, eptA, marA, mdtE, mdtF, mdtG, mdtH, mdtM, mdtN, mdtO, mdtP, mprA, tolC, yojI]
GO:0008653	Proceso metabólico de lipopolisacáridos	Grupo3	[arnC, eptA, ugd]
GO:0009103	Proceso biosintético de lipopolisacáridos	Grupo2	[arnC, eptA, ugd]
GO:0042493	Respuesta a la droga	Grupo4	[acrB, acrD, acrE, acrS, baeR, emrA, emrK, mdtC, mdtE, mdtF, mdtG, mdtM, mdtN, yojI]
GO:0015893	Transporte de drogas	Grupo3	[acrB, acrD, acrE, emrA, emrK, mdtC, mdtE, mdtF, mdtG, mdtM, mdtN, yojI]
GO:0006855	Transporte transmembrana de fármacos	Grupo3	[acrB, acrD, acrE, emrA, emrK, mdtE, mdtF, mdtG, mdtM, mdtN]
GO:0072348	Transporte de compuestos de azufre	Grupo5	[mdtN, mdtO, mdtP]
GO:0042886	Transporte de amida	Grupo4	[mdtN, mdtO, mdtP, yojI]
GO:0045117	Transporte de azoles	Grupo4	[mdtN, mdtO, mdtP]
GO:0015906	Transporte de sulfatiazol	Grupo4	[mdtN, mdtO, mdtP]

GO:1902599	Transporte transmembrana de sulfatiazol	Grupo4	[mdtN, mdtO, mdtP]
GO:0007165	Transducción	Grupo6	[baeR, baeS, cpxA, evgA, evgS, kdpE]
GO:0035556	Transducción de señales intracelulares	Grupo5	[baeR, baeS, cpxA, evgA, evgS, kdpE]
GO:0023014	Transducción de señales por fosforilación de proteínas	Grupo5	[baeS, cpxA, evgS]
GO:0000160	Sistema de transducción de señal de fosforesforé	Grupo5	[baeR, baeS, cpxA, evgA, evgS, kdpE]
GO:0018193	Modificación de peptidil-aminoácidos	Grupo5	[baeS, cpxA, evgS]
GO:0018202	Modificación del peptidil-histidina	Grupo5	[baeS, cpxA, evgS]
GO:0046777	Autofosforilación de proteínas	Grupo5	[baeS, cpxA, evgS]
GO:0018106	Fosforilación de peptidil-histidina	Grupo5	[baeS, cpxA, evgS]
GO:0006081	Proceso metabólico de aldehídos celulares	Grupo7	[gadW, gadX, marA]
GO:0042180	Proceso metabólico de cetonas celulares	Grupo6	[gadW, gadX, marA]
GO:0009891	Regulación positiva del proceso biosintético	Grupo6	[baeR, gadX, marA]
GO:0046185	Proceso catabólico de aldehído	Grupo6	[gadW, gadX, marA]
GO:0051173	Regulación positiva del proceso metabólico de los compuestos nitrogenados	Grupo6	[baeR, gadX, marA]
GO:0009438	Proceso metabólico metilglioxal	Grupo6	[gadW, gadX, marA]
GO:0042182	Proceso catabólico de cetonas	Grupo6	[gadW, gadX, marA]
GO:0010557	Regulación positiva del proceso biosintético de macromoléculas	Grupo6	[baeR, gadX, marA]
GO:0010628	Regulación positiva de la expresión génica	Grupo6	[baeR, gadX, marA]
GO:0031328	Regulación positiva del proceso biosintético celular	Grupo6	[baeR, gadX, marA]
GO:0045935	Regulación positiva del proceso metabólico compuesto que contiene nucleobases	Grupo6	[baeR, gadX, marA]
GO:0051596	Proceso catabólico metilglioxal	Grupo6	[gadW, gadX, marA]
GO:0051254	Regulación positiva del proceso metabólico del ARN	Grupo6	[baeR, gadX, marA]
GO:0006089	Proceso metabólico del lactato	Grupo6	[gadW, gadX, marA]
GO:0061727	Proceso catabólico metilglioxal a lactato	Grupo6	[gadW, gadX, marA]
GO:1902680	Regulación positiva del proceso biosintético de ARN	Grupo6	[baeR, gadX, marA]
GO:0019243	Proceso catabólico metilglioxal a D-lactato a través de S-lactoil-glutación	Grupo6	[gadW, gadX, marA]
GO:0045893	Regulación positiva de la transcripción, con plantilla de ADN	Grupo6	[baeR, gadX, marA]
GO:1903508	Regulación positiva de la transcripción con plantilla de ácidos nucleicos	Grupo6	[baeR, gadX, marA]

ID GMF	Descripción	Grupos	Associated Genes Found
GO:0046677	Respuesta al antibiótico	Grupo1	[arnC, emrB, emrK, emrY, eptA, marA, mdtE, mdtF, mdtM, mdtN, mdtO, mdtP, mprA]
GO:0042493	Respuesta a la droga	Grupo2	[baeR, emrK, mdtE, mdtF, mdtM, mdtN]
GO:0015893	Transporte de drogas	Grupo2	[emrK, mdtE, mdtF, mdtM, mdtN]
GO:0006855	Transporte transmembrana de fármacos	Grupo2	[emrK, mdtE, mdtF, mdtM, mdtN]
GO:0072348	Transporte de compuestos de azufre	Grupo3	[mdtN, mdtO, mdtP]
GO:0042886	Transporte de amida	Grupo3	[mdtN, mdtO, mdtP]
GO:0045117	Transporte de azoles	Grupo3	[mdtN, mdtO, mdtP]
GO:0015906	Transporte de sulfatiazol	Grupo3	[mdtN, mdtO, mdtP]
GO:1902599	Transporte transmembrana de sulfatiazol	Grupo3	[mdtN, mdtO, mdtP]
GO:0009891	Regulación positiva del proceso biosintético	Grupo4	[baeR, gadX, marA]
GO:0051173	Regulación positiva del proceso metabólico de los compuestos nitrogenados	Grupo4	[baeR, gadX, marA]
GO:0010557	Regulación positiva del proceso biosintético de macromoléculas	Grupo4	[baeR, gadX, marA]
GO:0010628	Regulación positiva de la expresión génica	Grupo4	[baeR, gadX, marA]
GO:0031328	Regulación positiva del proceso biosintético celular	Grupo4	[baeR, gadX, marA]
GO:0045935	Regulación positiva del proceso metabólico compuesto que contiene nucleobases	Grupo4	[baeR, gadX, marA]
GO:0051254	Regulación positiva del proceso metabólico del ARN	Grupo4	[baeR, gadX, marA]
GO:1902680	Regulación positiva del proceso biosintético de ARN	Grupo4	[baeR, gadX, marA]
GO:0045893	Regulación positiva de la transcripción, con plantilla de ADN	Grupo4	[baeR, gadX, marA]
GO:1903508	Regulación positiva de la transcripción con plantilla de ácidos nucleicos	Grupo4	[baeR, gadX, marA]

CAPÍTULO 8

9. Referencias

- Alexander, J., Hembach, N., Schwartz, T., 2022. Identification of critical control points for antibiotic resistance discharge in sewers. *Science of The Total Environment* 820, 153186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153186>
- Allahverdiyev, A.M., Kon, K.V., Abamor, E.S., Bagirova, M., Rafailovich, M., 2011. Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 9, 1035–1052. <https://doi.org/10.1586/eri.11.121>
- Ammam, F., Meziane-cherif, D., Mengin-Lecreulx, D., Blanot, D., Patin, D., Boneca, I.G., Courvalin, P., Lambert, T., Candela, T., 2013. The functional cluster of *lostridium difficile* does not confer vancomycin resistance. *Molecular Microbiology* 89, 612–625. <https://doi.org/10.1111/mmi.12299>
- Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Angst, D.C., Tepekule, B., Sun, L., Bogos, B., Bonhoeffer, S., 2021. Comparing treatment strategies to reduce antibiotic resistance in an in vitro

epidemiological setting. Proceedings of the National Academy of Sciences 118, e2023467118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023467118>

Aslam, B., Rasool, M., Muzammil, S., Siddique, A.B., Nawaz, Z., Shafique, M., Zahoor, M.A., Binyamin, R., Waseem, M., Khurshid, M., Arshad, M.I., Aslam, M.A., Shahzad, N., Rasool, M.H., Baloch, Z., 2020. Carbapenem Resistance: Mechanisms and Drivers of Global Menace, Pathogenic Bacteria. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90100>

Aslam, B., Wang, W., Arshad, M.I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M.H., Nisar, M.A., Alvi, R.F., Aslam, M.A., Qamar, M.U., Salamat, M.K.F., Baloch, Z., 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infect Drug Resist 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>

Assimakopoulos, S.F., Karamouzos, V., Lefkaditi, A., Sklavou, C., Kolonitsiou, F., Christofidou, M., Fligou, F., Gogos, C., Marangos, M., 2019. Triple combination therapy with high-dose ampicillin/sulbactam, high-dose tigecycline and colistin in the treatment of ventilator-associated pneumonia caused by pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*: a case series study. Infez Med 27, 11–16.

Baldwin, C.M., Lyseng-Williamson, K.A., Keam, S.J., 2008. Meropenem. Drugs 68, 803–838. <https://doi.org/10.2165/00003495-200868060-00006>

- Baptista, P.V., McCusker, M.P., Carvalho, A., Ferreira, D.A., Mohan, N.M., Martins, M., Fernandes, A.R., 2018. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria—"A Battle of the Titans." *Frontiers in Microbiology* 9.
- Baranova, N., Nikaido, H., 2002. The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* 184, 4168–4176. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4168-4176.2002>
- Barbee, L.A., Soge, O.O., Holmes, K.K., Golden, M.R., 2014. In vitro synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69, 1572–1578. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt540>
- Baron, S., Leulmi, Z., Villard, C., Olaitan, A.O., Telke, A.A., Rolain, J.-M., 2018. Inactivation of the *arn* operon and loss of aminoarabinose on lipopolysaccharide as the cause of susceptibility to colistin in an atypical clinical isolate of *proteus vulgaris*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 51, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.017>
- Bassetti, M., Nicolini, L., Esposito, S., Righi, E., Viscoli, C., 2009. Current status of newer carbapenems. *Curr Med Chem* 16, 564–575. <https://doi.org/10.2174/092986709787458498>

- Baym, M., Lieberman, T.D., Kelsic, E.D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I., Kishony, R., 2016. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* 353, 1147–1151. <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>
- Bedenić, B., Cavrić, G., Vranić-Ladavac, M., Barišić, N., Karčić, N., Tot, T., Presečki-Stanko, A., Lukić-Grić, A., Frančula-Zaninović, S., Sreter, K.B., 2018. COMPARISON OF TWO DIFFERENT METHODS FOR TIGECYCLINE SUSCEPTIBILITY TESTING IN ACINETOBACTER BAUMANNII. *Acta Clin Croat* 57, 618–623. <https://doi.org/10.20471/acc.2018.57.04.02>
- Benveniste, R., Davies, J., 1973. Aminoglycoside Antibiotic-Inactivating Enzymes in Actinomycetes Similar to Those Present in Clinical Isolates of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70, 2276–2280. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.8.2276>
- Bercovier, H., Kafri, O., Sela, S., 1986. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 136, 1136–1141. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)90452-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90452-3)
- Berríos-Caro, E., Gifford, D.R., Galla, T., 2021. Competition delays multi-drug resistance evolution during combination therapy. *Journal of Theoretical Biology* 509, 110524. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2020.110524>

- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J., 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
- Blondeau, J.M., 2009. New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Veterinary Dermatology* 20, 383–396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00856.x>
- Bos, J., Zhang, Q., Vyawahare, S., Rogers, E., Rosenberg, S.M., Austin, R.H., 2015. Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 178–183. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420702111>
- Bottery, M.J., Pitchford, J.W., Friman, V.-P., 2021. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *ISME J* 15, 939–948. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00832-7>
- Böttger, E.C., Crich, D., 2020. Aminoglycosides: Time for the Resurrection of a Neglected Class of Antibacterials? *ACS Infect. Dis.* 6, 168–172. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00441>

- Brandi, A., Giangrossi, M., Fabbretti, A., Falconi, M., 2020. The hns Gene of *Escherichia coli* Is Transcriptionally Down-Regulated by (p)ppGpp. *Microorganisms* 8, 1558. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101558>
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., Karaman, R., 2020. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules* 25, 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Bulgakova, V.G., Vinogradova, K.A., Orlova, T.I., Kozhevin, P.A., Polin, A.N., 2014. [Action of antibiotics as signalling molecules]. *Antibiot Khimioter* 59, 36–43.
- Cayci, Y.T., Ulker, K.H., Birinci, A., 2021. Evaluation of three different methods for susceptibility testing of gentamicin in carbapenem resistant *Enterobacterales*. *Infez Med* 29, 568–573. <https://doi.org/10.53854/liim-2904-10>
- Chandran, S. p., Diwan, V., Tamhankar, A. j., Joseph, B. v., Rosales-Klintz, S., Mundayoor, S., Lundborg, C. s., Macaden, R., 2014. Detection of carbapenem resistance genes and cephalosporin, and quinolone resistance genes along with *oqxAB* gene in *Escherichia coli* in hospital wastewater: a matter of concern. *Journal of Applied Microbiology* 117, 984–995. <https://doi.org/10.1111/jam.12591>

- Chellat, M.F., Raguž, L., Riedl, R., 2016. Targeting Antibiotic Resistance. *Angewandte Chemie International Edition* 55, 6600–6626. <https://doi.org/10.1002/anie.201506818>
- Chen, S., Zhou, Y., Song, L., Yang, Y., He, F., Chen, Q., Cheng, X., Rehman, R., 2022. Metagenomics Analysis of Microbial Species and Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in Untreated Wastewater from Different Types of Hospitals in Hangzhou. *Adsorption Science & Technology* 2022, 3344026. <https://doi.org/10.1155/2022/3344026>
- Cheung, C.H.P., Dulyayangkul, P., Heesom, K.J., Avison, M.B., 2020. Proteomic Investigation of the Signal Transduction Pathways Controlling Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64, 10.1128/aac.00790-20. <https://doi.org/10.1128/aac.00790-20>
- Chey, W.D., Leontiadis, G.I., Howden, C.W., Moss, S.F., 2017. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* 112, 212–239. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.563>
- Ching, C., Zaman, M.H., 2020. Development and selection of low-level multi-drug resistance over an extended range of sub-inhibitory ciprofloxacin

concentrations in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 10, 8754.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65602-z>

Chiu, S.-K., Huang, L.-Y., Chen, H., Tsai, Y.-K., Liou, C.-H., Lin, J.-C., Siu, L.K., Chang, F.-Y., Yeh, K.-M., 2017. Roles of *ramR* and *tet* (A) Mutations in Conferring Tigecycline Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 61, e00391-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00391-17>

Chouchani, C., Marrakchi, R., El Salabi, A., 2011. Evolution of β -lactams resistance in Gram-negative bacteria in Tunisia. *Critical Reviews in Microbiology* 37, 167–177.
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.552880>

Coates, A.R.M., Hu, Y., Holt, J., Yeh, P., 2020. Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: synergy, rejuvenation and resistance reduction. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 18, 5–15.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1705155>

Colijn, C., Cohen, T., Ganesh, A., Murray, M., 2011. Spontaneous Emergence of Multiple Drug Resistance in Tuberculosis before and during Therapy. *PLoS One* 6, e18327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018327>

Cross, T., Ransegnola, B., Shin, J.-H., Weaver, A., Fauntleroy, K., VanNieuwenhze, M.S., Westblade, L.F., Dörr, T., 2019. Spheroplast-

Mediated Carbapenem Tolerance in Gram-Negative Pathogens.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 63, 10.1128/aac.00756-19.
<https://doi.org/10.1128/aac.00756-19>

Dartois, V.A., Rubin, E.J., 2022. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nat Rev Microbiol* 20, 685–701. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00731-y>

D’Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., Wright, G.D., 2006. Sampling the Antibiotic Resistome. *Science* 311, 374–377.
<https://doi.org/10.1126/science.1120800>

Depardieu, F., Bonora, M.G., Reynolds, P.E., Courvalin, P., 2003. The vanG glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Molecular Microbiology* 50, 931–948. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03737.x>

Doi, Y., 2019. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis* 69, S565–S575.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciz830>

Doi, Y., Wachino, J., Arakawa, Y., 2016. Aminoglycoside Resistance. *Infectious Disease Clinics of North America* 30, 523–537.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>

- Doyle, D., McDowall, K.J., Butler, M.J., Hunter, I.S., 1991. Characterization of an oxytetracycline-resistance gene, *otrA*, of *Streptomyces rimosus*. *Molecular Microbiology* 5, 2923–2933. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01852.x>
- Drusano, G., 1997. Meropenem: laboratory and clinical data. *Clinical Microbiology and Infection* 3, 4S51-4S59. [https://doi.org/10.1016/S1198-743X\(14\)65034-5](https://doi.org/10.1016/S1198-743X(14)65034-5)
- Du, X., He, F., Shi, Q., Zhao, F., Xu, J., Fu, Y., Yu, Y., 2018. The Rapid Emergence of Tigecycline Resistance in *blaKPC-2* Harboring *Klebsiella pneumoniae*, as Mediated in Vivo by Mutation in *tetA* During Tigecycline Treatment. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Durante-Mangoni, E., Andini, R., Zampino, R., 2019. Management of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Clinical Microbiology and Infection* 25, 943–950. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.013>
- Durão, P., Balbontín, R., Gordo, I., 2018. Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol* 26, 677–691. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.005>

El paquete ggplot2 [WWW Document], n.d. . R CHARTS | Una colección de gráficos hechos con el lenguaje de programación R. URL <https://r-charts.com/es/ggplot2/> (accessed 10.15.24).

Elkins, C.A., Nikaido, H., 2003. Chimeric Analysis of AcrA Function Reveals the Importance of Its C-Terminal Domain in Its Interaction with the AcrB Multidrug Efflux Pump. *J Bacteriol* 185, 5349–5356. <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5349-5356.2003>

Elshamy, A.A., Aboshanab, K.M., 2020. A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future Science OA* 6, FSO438. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0098>

Erol, I., Jeong, K.-C., Baumler, D.J., Vykhodets, B., Ho Choi, S., Kaspar, C.W., 2006. H-NS controls metabolism and stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7 that influence mouse passage. *BMC Microbiology* 6, 72. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-72>

Fan, P., Ma, Z., Partow, A.J., Kim, M., Shoemaker, G.M., Tan, R., Tong, Z., Nelson, C.D., Jang, Y., Jeong, K.C., 2022. A novel combination therapy for multidrug resistant pathogens using chitosan nanoparticles loaded with β -lactam antibiotics and β -lactamase inhibitors. *International Journal of Biological Macromolecules* 195, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.035>

- Ford, A.C., Gurusamy, K.S., Delaney, B., Forman, D., Moayyedi, P., 2016. Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori*-positive people. *Cochrane Database Syst Rev* 2016, CD003840. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003840.pub5>
- Freire, C.M.A. dos S., Taunay-Rodrigues, A., Gonzatti, M.B., Fonseca, F.M.P., Freire, J.E. da C., 2021. Nuevos conocimientos sobre la proteína EptA y su correlación con el gen *pmrC* en la resistencia a la polimixina en *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Research in Microbial Sciences* 2, 100042. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100042>
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., Ramos, J.L., 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 393–410. <https://doi.org/10.1128/mmb.61.4.393-410.1997>
- Garallah, E.T., Al-Jubori, S.S., 2020. Molecular detection of *glpT* and *uhpT* genes as fosfomicin pathways in UTI infection patients. *Gene Reports* 21, 100930. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100930>
- Garza-Cervantes, J.A., Meza-Bustillos, J.F., Resendiz-Hernández, H., Suárez-Cantú, I.A., Ortega-Rivera, O.A., Salinas, E., Escárcega-González, C.E., Morones-Ramírez, J.R., 2020. Re-sensitizing Ampicillin and Kanamycin-Resistant *E. coli* and *S. aureus* Using Synergistic Metal

Micronutrients-Antibiotic Combinations. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 612. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00612>

Gillespie, S.H., 2002. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 267–274. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.267-274.2002>

Graves, J.L., Tajkarimi, M., Cunningham, Q., Campbell, A., Nonga, H., Harrison, S.H., Barrick, J.E., 2015. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Frontiers in Genetics* 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00042>

Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLOS Pathogens* 7, e1002158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>

Gunawan, C., Marquis, C.P., Amal, R., Sotiriou, G.A., Rice, S.A., Harry, E.J., 2017. Widespread and Indiscriminate Nanosilver Use: Genuine Potential for Microbial Resistance. *ACS Nano* 11, 3438–3445. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01166>

Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K., Miller, S.I., 2000. Genetic and Functional Analysis of a PmrA-PmrB-Regulated Locus

Necessary for Lipopolysaccharide Modification, Antimicrobial Peptide Resistance, and Oral Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity* 68, 6139–6146. <https://doi.org/10.1128/iai.68.11.6139-6146.2000>

Hanafiah, A., Sukri, A., Yusoff, H., Chan, C.S., Hazrin-Chong, N.H., Salleh, S.A., Neoh, H., 2024. Insights into the Microbiome and Antibiotic Resistance Genes from Hospital Environmental Surfaces: A Prime Source of Antimicrobial Resistance. *Antibiotics* 13, 127. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020127>

Hayward, R.S., Harding, J., Molloy, R., Land, L., Longcroft-Neal, K., Moore, D., Ross, J.D.C., 2018. Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology* 84, 223–238. <https://doi.org/10.1111/bcp.13439>

Hendriksen, R.S., Bortolaia, V., Tate, H., Tyson, G.H., Aarestrup, F.M., McDermott, P.F., 2019. Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. *Front Public Health* 7, 242. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00242>

Hirakawa, H., Nishino, K., Yamada, J., Hirata, T., Yamaguchi, A., 2003. β -Lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia*

coli. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52, 576–582.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkg406>

Hirakawa, H., Takumi-Kobayashi, A., Theisen, U., Hirata, T., Nishino, K., Yamaguchi, A., 2008. AcrS/EnvR Represses Expression of the acrAB Multidrug Efflux Genes in Escherichia coli. J Bacteriol 190, 6276–6279. <https://doi.org/10.1128/JB.00190-08>

Hochvaldová, L., Panáček, D., Válková, L., Pucek, R., Kohlová, V., Večeřová, R., Kolář, M., Kvítek, L., Panáček, A., 2022. Restoration of antibacterial activity of inactive antibiotics via combined treatment with a cyanographene/Ag nanohybrid. Sci Rep 12, 5222. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09294-7>

Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D.Y., Wong, V.W.S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., Ng, S.C., 2017. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterology 153, 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>

Huang, J., Zhu, Y., Han, M., Li, M., Song, J., Velkov, T., Li, C., Li, J., 2018. Comparative analysis of phosphoethanolamine transferases involved in polymyxin resistance across ten clinically relevant Gram-negative

bacteria. Int J Antimicrob Agents 51, 586–593.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.12.016>

Island, M.D., Wei, B.Y., Kadner, R.J., 1992. Structure and function of the uhp genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 174, 2754–2762.

Iwamoto, A., Tanahashi, T., Okada, R., Yoshida, Y., Kikuchi, K., Keida, Y., Murakami, Y., Yang, L., Yamamoto, K., Nishiumi, S., Yoshida, M., Azuma, T., 2014. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. Gut Pathogens 6, 27. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-27>

Jaccard, P., 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. <https://doi.org/10.5169/SEALS-266450>

Jain, M., Nagar, P., Sharma, A., Batth, R., Aggarwal, S., Kumari, S., Mustafiz, A., 2018. GLYI and D-LDH play key role in methylglyoxal detoxification and abiotic stress tolerance. Scientific Reports 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23806-4>

Jiang, S.-S., Liu, M.-C., Teng, L.-J., Wang, W.-B., Hsueh, P.-R., Liaw, S.-J., 2010. *Proteus mirabilis* pmrl, an RppA-Regulated Gene Necessary for Polymyxin B Resistance, Biofilm Formation, and Urothelial Cell

Invasion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 1564–1571.
<https://doi.org/10.1128/aac.01219-09>

Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P., Panos, G., 2021. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. *Antibiotics* 10, 415.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10040415>

Kerantzas, C.A., Jacobs, W.R., 2017. Origins of Combination Therapy for Tuberculosis: Lessons for Future Antimicrobial Development and Application. *mBio* 8, e01586-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01586-16>

Kerek, Á., Török, B., Laczkó, L., Somogyi, Z., Kardos, G., Bányai, K., Kaszab, E., Bali, K., Jerzsele, Á., 2024. In Vitro Microevolution and Co-Selection Assessment of Amoxicillin and Cefotaxime Impact on *Escherichia coli* Resistance Development. *Antibiotics* 13, 247.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics13030247>

Kim, D.-W., Cha, C.-J., 2021. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Exp Mol Med* 53, 301–309.
<https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z>

- Kim, H.-R., Eom, Y.-B., 2021. Synergistic Activity of Equol and Meropenem against Carbapenem-Resistant *Escherichia coli*. *Antibiotics* 10, 161. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020161>
- Kim, T.H., Park, J.M., Cheung, D.Y., Oh, J.H., 2020. Comparison of 7- and 14-Day Eradication Therapy for *Helicobacter pylori* with First- and Second-Line Regimen: Randomized Clinical Trial. *J Korean Med Sci* 35, e33. <https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e33>
- Klein, E.Y., Van Boeckel, T.P., Martínez, E.M., Pantalón, Suraj, Gandra, S., Levin, S.A., Goossens, H., Laxminarayan, R., 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
- Knöppel, A., Lind, P.A., Lustig, U., Näsvall, J., Andersson, D.I., 2014. Minor Fitness Costs in an Experimental Model of Horizontal Gene Transfer in Bacteria. *Molecular Biology and Evolution* 31, 1220–1227. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu076>
- Köser, C.U., Ellington, M.J., Peacock, S.J., 2014. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends in Genetics* 30, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.003>

Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S., 2000. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 3249–3256. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000>

Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E., 2016. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>

La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed 2.17.22).

Lai, H.-Y., Cooper, T.F., 2024. Costs of antibiotic resistance genes depend on host strain and environment and can influence community composition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 291, 20240735. <https://doi.org/10.1098/rspb.2024.0735>

Lázár, V., Nagy, I., Spohn, R., Csörgő, B., Györkei, Á., Nyerges, Á., Horváth, B., Vörös, A., Busa-Fekete, R., Hrtyan, M., Bogos, B., Méhi, O., Fekete, G., Szappanos, B., Kégl, B., Papp, B., Pál, C., 2014. Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance

interaction network. Nat Commun 5, 4352.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5352>

Lee, J.S., Choi, J.-Y., Chung, E.S., Peck, K.R., Ko, K.S., 2019. Variation in the formation of persister cells against meropenem in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia and analysis of its clinical features. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 95, 114853.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.06.005>

Lee, N.-Y., Ko, W.-C., Hsueh, P.-R., 2019. Nanoparticles in the Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Organisms. Frontiers in Pharmacology 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01153>

Levin-Reisman, I., Brauner, A., Ronin, I., Balaban, N.Q., 2019. Epistasis between antibiotic tolerance, persistence, and resistance mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences 116, 14734–14739.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1906169116>

Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoshitaishvili, N., Balaban, N.Q., 2017. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. Science 355, 826–830. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>

Li, H., Zhou, M., Chen, X., Zhang, Y., Jian, Z., Yan, Q., Liu, W.-E., 2021. Comparative Evaluation of Seven Tigecycline Susceptibility Testing

Methods for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Infect Drug Resist 14, 1511–1516. <https://doi.org/10.2147/IDR.S289499>

Liang, Z., Huang, L., Liu, H., Zheng, Y., Feng, J., Shi, Z., Chen, Y., Lv, M., Zhou, J., Zhang, L., Chen, S., 2023. Characterization of the Arn lipopolysaccharide modification system essential for zeamine resistance unveils its new roles in *Dickeya oryzae* physiology and virulence. Mol Plant Pathol 24, 1480–1494. <https://doi.org/10.1111/mpp.13386>

Lin, Q., Wu, M., Yu, H., Jia, X., Zou, H., Ma, D., Niu, S., Huang, S., 2021. Clinical and Microbiological Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriales: A Prospective Cohort Study. Frontiers in Pharmacology 12.

Lin, Q.Y., Tsai, Y.-L., Liu, M.-C., Lin, W.-C., Hsueh, P.-R., Liaw, S.-J., 2014. *Serratia marcescens* *arn*, a PhoP-Regulated Locus Necessary for Polymyxin B Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58, 5181–5190. <https://doi.org/10.1128/aac.00013-14>

Lipsitch, M., Samore, M.H., 2002. Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance: A Population Perspective. Emerg Infect Dis 8, 347–354. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010312>

Liu, G.-F., Li, G.-J., Zhao, H., 2018. Efficacy and Toxicity of Different Chemotherapy Regimens in the Treatment of Advanced or Metastatic

- Pancreatic Cancer: A Network Meta-Analysis. *Journal of Cellular Biochemistry* 119, 511–523. <https://doi.org/10.1002/jcb.26210>
- Liu, Z.-Q., Zheng, P.-Y., Yang, P.-C., 2008. Efflux pump gene *hefA* of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance. *World J Gastroenterol* 14, 5217–5222. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.5217>
- Ma, X., Dong, X., Cai, J., Fu, C., Yang, J., Liu, Y., Zhang, Y., Wan, T., Lin, S., Lou, Y., Zheng, M., 2022. Metagenomic Analysis Reveals Changes in Bacterial Communities and Antibiotic Resistance Genes in an Eye Specialty Hospital and a General Hospital Before and After Wastewater Treatment. *Front. Microbiol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.848167>
- Macia, M.D., Rojo-Molinero, E., Oliver, A., 2014. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 20, 981–990. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>
- Mainprize, I.L., Bean, J.D., Bouwman, C., Kimber, M.S., Whitfield, C., 2013. The UDP-glucose Dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12 Displays Substrate Inhibition by NAD That Is Relieved by Nucleotide Triphosphates. *J Biol Chem* 288, 23064–23074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486613>

- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C.A., Gisbert, J.P., Kuipers, E.J., Axon, A.T., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D.Y., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., El-Omar, E.M., 2017. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 66, 6–30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
- Martin, R.G., Rosner, J.L., 2001. The AraC transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol* 4, 132–137. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00178-8](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00178-8)
- Martínez, J.L., 2017. Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process. *F1000Res* 6, 51. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9685.1>
- Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., Alvarez-Ortega, C., 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 430–449. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x>
- Masuda, N., Church, G.M., 2002. *Escherichia coli* Gene Expression Responsive to Levels of the Response Regulator EvgA. *Journal of Bacteriology* 184, 6225. <https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6225-6234.2002>

- Mba, I.E., Nweze, E.I., 2021. Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects. *World J Microbiol Biotechnol* 37, 108. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03070-x>
- McArthur, A.G., Wagglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A.M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M.R., O'Brien, J.S., Pawlowski, A.C., Piddock, L.J.V., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A.D., Tang, I., Taylor, P.L., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T., Wright, G.D., 2013. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- McGrath, M., Gey van Pittius, N.C., van Helden, P.D., Warren, R.M., Warner, D.F., 2014. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69, 292–302. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt364>
- McKessar, S.J., Berry, A.M., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Paton, J.C., 2000. Genetic Characterization of vanG, a Novel Vancomycin Resistance Locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3224–3228.

- McPhee, J.B., Lewenza, S., Hancock, R.E.W., 2003. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 50, 205–217. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03673.x>
- Misra, K., Banerjee, A.B., Ray, S., Ray, M., 1995. Glyoxalase III from *Escherichia coli*: a single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione. *Biochem J* 305, 999–1003.
- Moazed, D., Noller, H.F., 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 327, 389–394. <https://doi.org/10.1038/327389a0>
- Montelongo-Peralta, L.Z., León-Buitimea, A., Palma-Nicolás, J.P., Gonzalez-Christen, J., Morones-Ramírez, J.R., 2019. Antibacterial Activity of combinatorial treatments composed of transition-metal/antibiotics against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* 9, 5471. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42049-5>
- Muhamad Hendri, N.A., Nor Amdan, N.A., Dounis, S.O., Sulaiman Najib, N., Louis, S.R., 2024. Ultrastructural and morphological studies on variables

- affecting *Escherichia coli* with selected commercial antibiotics. *Cell Surf* 11, 100120. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2024.100120>
- Müller, B., Borrell, S., Rose, G., Gagneux, S., 2013. The Heterogeneous Evolution of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet* 29, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.11.005>
- Munck, C., Gumpert, H.K., Wallin, A.I.N., Wang, H.H., Sommer, M.O.A., 2015. Prediction of resistance development against drug combinations by collateral responses to component drugs 29.
- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T., Yamaguchi, A., 2002. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J Bacteriol* 184, 4161–4167. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4161-4167.2002>
- Nagaraj, S., Chandran, S., Shamanna, P., Macaden, R., 2012. Carbapenem resistance among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital in south India. *Indian Journal of Medical Microbiology* 30, 93–95. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.93054>
- Neyfakh, A.A., Bidnenko, V.E., Chen, L.B., 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 4781–4785. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4781>

- Nguyen, H.Q., Nguyen, N.V., Contamin, L., Tran, T.H.T., Vu, T.T., Nguyen, H.V., Nguyen, N.L.T., Nguyen, S.T., Dang, A.D., Bañuls, A.-L., Nguyen, V.A.T., 2017. Quadruple-first line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Vietnam: What can we learn from genes? *Infection, Genetics and Evolution* 50, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.012>
- Ni, W., Han, Y., Liu, J., Wei, C., Zhao, J., Cui, J., Wang, R., Liu, Y., 2016. Tigecycline Treatment for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Medicine (Baltimore)* 95, e3126. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000003126>
- Niño-Martínez, N., Salas Orozco, M.F., Martínez-Castañón, G.-A., Torres Méndez, F., Ruiz, F., 2019. Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2808. <https://doi.org/10.3390/ijms20112808>
- Nishino, K., Honda, T., Yamaguchi, A., 2005. Genome-Wide Analyses of *Escherichia coli* Gene Expression Responsive to the BaeSR Two-Component Regulatory System. *Journal of Bacteriology* 187, 1763–1772. <https://doi.org/10.1128/jb.187.5.1763-1772.2005>

- Nishino, K., Inazumi, Y., Yamaguchi, A., 2003. Global Analysis of Genes Regulated by EvgA of the Two-Component Regulatory System in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185, 2667–2672. <https://doi.org/10.1128/JB.185.8.2667-2672.2003>
- Nishino, K., Senda, Y., Yamaguchi, A., 2008. CRP Regulator Modulates Multidrug Resistance of *Escherichia coli* by Repressing the *mdtEF* Multidrug Efflux Genes. *J Antibiot* 61, 120–127. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.120>
- Nishino, K., Yamaguchi, A., 2004. Role of Histone-Like Protein H-NS in Multidrug Resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 1423–1429. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1423-1429.2004>
- Nishino, K., Yamaguchi, A., 2002. EvgA of the Two-Component Signal Transduction System Modulates Production of the YhiUV Multidrug Transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 184, 2319–2323. <https://doi.org/10.1128/jb.184.8.2319-2323.2002>
- Novais, Â., Comas, I., Baquero, F., Cantón, R., Coque, T.M., Moya, A., González-Candelas, F., Galán, J.-C., 2010. Evolutionary Trajectories of Beta-Lactamase CTX-M-1 Cluster Enzymes: Predicting Antibiotic Resistance. *PLOS Pathogens* 6, e1000735. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000735>

Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 66, 86–92.

O'NEILL, J., 2014. Review on antimicrobial resistance: antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. tackling a crisis for the health and wealth of nations. London: UK Government and the Wellcome Trust.

Orkin, C., DeJesus, E., Sax, P.E., Arribas, J.R., Gupta, S.K., Martorell, C., Stephens, J.L., Stellbrink, H.-J., Wohl, D., Maggiolo, F., Thompson, M.A., Podzamczar, D., Hagins, D., Flamm, J.A., Brinson, C., Clarke, A., Huang, H., Acosta, R., Brainard, D.M., Collins, S.E., Martin, H., GS-US-380-1489, GS-US-380-1490 study investigators, 2020. Fixed-dose combination bictegravir, emtricitabine, and tenofovir alafenamide versus dolutegravir-containing regimens for initial treatment of HIV-1 infection: week 144 results from two randomised, double-blind, multicentre, phase 3, non-inferiority trials. *Lancet HIV* 7, e389–e400. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(20\)30099-0](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(20)30099-0)

Otasek, D., Morris, J.H., Bouças, J., Pico, A.R., Demchak, B., 2019. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis. *Genome Biol* 20, 185. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1758-4>

- Ovchinnikov, V., Stone, T.A., Deber, C.M., Karplus, M., 2018. Structure of the EmrE multidrug transporter and its use for inhibitor peptide design. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E7932–E7941. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802177115>
- Palmer, A.C., Kishony, R., 2013. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Genet* 14, 243–248. <https://doi.org/10.1038/nrg3351>
- Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., Dyčka, F., Šebela, M., Prucek, R., Tomanec, O., Zbořil, R., 2018. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotech* 13, 65–71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>
- Papp, M., Solymosi, N., 2022. Review and Comparison of Antimicrobial Resistance Gene Databases. *Antibiotics (Basel)* 11, 339. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030339>
- Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A., 2011. Carbapenems: Past, Present, and Future ▽. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- Park, G.C., Choi, J.A., Jang, S.J., Jeong, S.H., Kim, C.-M., Choi, I.S., Kang, S.H., Park, G., Moon, D.S., 2016. In Vitro Interactions of Antibiotic

Combinations of Colistin, Tigecycline, and Doripenem Against Extensively Drug-Resistant and Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Lab Med* 36, 124–130. <https://doi.org/10.3343/alm.2016.36.2.124>

Paul, M., Carmeli, Y., Durante-Mangoni, E., Mouton, J.W., Tacconelli, E., Theuretzbacher, U., Mussini, C., Leibovici, L., 2014. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 69, 2305–2309. <https://doi.org/10.1093/jac/dku168>

Perry, M.R., Lepper, H.C., McNally, L., Wee, B.A., Munk, P., Warr, A., Moore, B., Kalima, P., Philip, C., de Roda Husman, A.M., Aarestrup, F.M., Woolhouse, M.E.J., van Bunnik, B.A.D., 2021. Secrets of the Hospital Underbelly: Patterns of Abundance of Antimicrobial Resistance Genes in Hospital Wastewater Vary by Specific Antimicrobial and Bacterial Family. *Front Microbiol* 12, 703560. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703560>

pheatmap function in R [WWW Document], 2021. . R CHARTS | A collection of charts and graphs made with the R programming language. URL <https://r-charts.com/correlation/pheatmap/> (accessed 10.15.24).

Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by

Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews* 30, 557–596.

<https://doi.org/10.1128/cmr.00064-16>

Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S., 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>

Ponmalar, I.I., Swain, J., Basu, J.K., 2022. Modification of bacterial cell membrane dynamics and morphology upon exposure to sub inhibitory concentrations of ciprofloxacin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1864, 183935. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183935>

Prammananan, T., Sander, P., Brown, B.A., Frischkorn, K., Onyi, G.O., Zhang, Y., Böttger, E.C., Wallace, Jr., R.J., 1998. A Single 16S Ribosomal RNA Substitution Is Responsible for Resistance to Amikacin and Other 2-Deoxystreptamine Aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J INFECT DIS* 177, 1573–1581. <https://doi.org/10.1086/515328>

Quality Scores And Read Accuracy [WWW Document], 2021. . EPI2ME Labs. URL <https://labs.epi2me.io/quality-scores/> (accessed 1.19.24).

R: The R Project for Statistical Computing [WWW Document], n.d. URL <https://www.r-project.org/> (accessed 5.9.24).

Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E.P.C., Garcillán-Barcia, M.P., de la Cruz, F., 2020. Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nat Commun* 11, 3602. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17278-2>

Reygaert, W.C., 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* 4, 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

Rowe, W.P.M., Baker-Austin, C., Verner-Jeffreys, D.W., Ryan, J.J., Micallef, C., Maskell, D.J., Pearce, G.P., 2017. Overexpression of antibiotic resistance genes in hospital effluents over time. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72, 1617–1623. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx017>

Ruiz, C., Levy, S.B., 2010. Many Chromosomal Genes Modulate MarA-Mediated Multidrug Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 2125–2134. <https://doi.org/10.1128/aac.01420-09>

Saeb, A.T., Abouelhoda, M., Selvaraju, M., Althawadi, S.I., Mutabagani, M., Adil, M., Al Hokail, A., Tayeb, H.T., 2017. The Use of Next-Generation

Sequencing in the Identification of a Fastidious Pathogen: A Lesson From a Clinical Setup. *Evol Bioinform Online* 13, 1176934316686072. <https://doi.org/10.1177/1176934316686072>

Safi, H., Lingaraju, S., Amin, A., Kim, S., Jones, M., Holmes, M., McNeil, M., Peterson, S.N., Chatterjee, D., Fleischmann, R., Alland, D., 2013. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl- β -D-arabinose biosynthetic and utilization pathway genes. *Nat Genet* 45, 1190–1197. <https://doi.org/10.1038/ng.2743>

Salmon-Rousseau, A., Martins, C., Blot, M., Buisson, M., Mahy, S., Chavanet, P., Piroth, L., 2020. Comparative review of imipenem/cilastatin versus meropenem. *Médecine et Maladies Infectieuses* 50, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.01.001>

Salud, O.M. de la, 2017. Directrices de la OMS sobre el uso de antimicrobianos de importancia médica en animales destinados a la producción de alimentos: reseña de política.

Samantha, A., Vrielink, A., 2020. Lipid A Phosphoethanolamine Transferase: Regulation, Structure and Immune Response. *Journal of Molecular Biology, Molecular Mechanisms in Integral Membrane Enzymology* 432, 5184–5196. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.022>

- Savoldi, A., Carrara, E., Piddock, L.J.V., Franceschi, F., Ellis, S., Chiamenti, M., Bragantini, D., Righi, E., Tacconelli, E., 2021. The role of combination therapy in the treatment of severe infections caused by carbapenem resistant gram-negatives: a systematic review of clinical studies. BMC Infect Dis 21, 545. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06253-x>
- Schmid, A., Wolfensberger, A., Nemeth, J., Schreiber, P.W., Sax, H., Kuster, S.P., 2019. Monotherapy versus combination therapy for multidrug-resistant Gram-negative infections: Systematic Review and Meta-Analysis. Sci Rep 9, 15290. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51711-x>
- Schneiders, T., Barbosa, T.M., McMurry, L.M., Levy, S.B., 2004. El regulador transcripcional MarA de *Escherichia coli* reprime directamente la transcripción de *purA* y *hdeA**. Journal of Biological Chemistry 279, 9037–9042. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313602200>
- Schwartz, J.J., Gazumyan, A., Schwartz, I., 1992. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol 174, 3757–3765. <https://doi.org/10.1128/jb.174.11.3757-3765.1992>
- Seregina, T.A., Petrushanko, I.Yu., Shakulov, R.S., Zaripov, P.I., Makarov, A.A., Mitkevich, V.A., Mironov, A.S., 2022. The Inactivation of LPS

Biosynthesis Genes in *E. coli* Cells Leads to Oxidative Stress. *Cells* 11, 2667. <https://doi.org/10.3390/cells11172667>

Serio, A.W., Keepers, T., Andrews, L., Krause, K.M., 2018. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus* 8, ecosalplus.ESP-0002-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018>

Serio, A.W., Magalhães, M.L., Blanchard, J.S., Connolly, L.E., 2017. Aminoglycosides: Mechanisms of Action and Resistance, in: Mayers, D.L., Sobel, J.D., Ouellette, M., Kaye, K.S., Marchaim, D. (Eds.), *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*, Volume 1. Springer International Publishing, Cham, pp. 213–229. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4_14

Steffens, N.A., Zimmermann, E.S., Nichelle, S.M., Brucker, N., 2021. Meropenem use and therapeutic drug monitoring in clinical practice: a literature review. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 46, 610–621. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13369>

Sukri, A., Hanafiah, A., Mohamad Zin, N., Kosai, N.R., 2020. Epidemiology and role of *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric cancer carcinogenesis. *APMIS* 128, 150–161. <https://doi.org/10.1111/apm.13034>

- Talat, A., Blake, K.S., Dantas, G., Khan, A.U., 2023. Metagenomic Insight into Microbiome and Antibiotic Resistance Genes of High Clinical Concern in Urban and Rural Hospital Wastewater of Northern India Origin: a Major Reservoir of Antimicrobial Resistance. *Microbiology Spectrum* 11, e04102-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04102-22>
- Tamma, P.D., Cosgrove, S.E., Maragakis, L.L., 2012. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 25, 450–470. <https://doi.org/10.1128/CMR.05041-11>
- Terbtthakun, P., Nwabor, O.F., Siriyong, T., Voravuthikunchai, S.P., Chusri, S., 2021. Synergistic Antibacterial Effects of Meropenem in Combination with Aminoglycosides against Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Harboring blaNDM-1 and blaNDM-5 14.
- Thomson, N.M., Turner, A.K., Yasir, M., Bastkowski, S., Lott, M., Webber, M.A., Charles, I.G., 2022. A whole-genome assay identifies four principal gene functions that confer tolerance of meropenem stress upon *Escherichia coli*. *Front. Antibiot.* 1. <https://doi.org/10.3389/frabi.2022.957942>
- Thornalley, P.J., 1990. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 269, 1–11.

- Toprak, E., Veres, A., Michel, J.-B., Chait, R., Hartl, D.L., Kishony, R., 2011. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug stress. *Nat Genet* 44, 101–105. <https://doi.org/10.1038/ng.1034>
- Torella, J.P., Chait, R., Kishony, R., 2010. Optimal Drug Synergy in Antimicrobial Treatments. *PLoS Comput Biol* 6, e1000796. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000796>
- Torres, A., Zhong, N., Pacht, J., Timsit, J.-F., Kollef, M., Chen, Z., Song, J., Taylor, D., Laud, P.J., Stone, G.G., Chow, J.W., 2018. Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet Infectious Diseases* 18, 285–295. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30747-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30747-8)
- Tramonti, A., Visca, P., De Canio, M., Falconi, M., De Biase, D., 2002. Functional Characterization and Regulation of gadX, a Gene Encoding an AraC/XylS-Like Transcriptional Activator of the Escherichia coli Glutamic Acid Decarboxylase System. *Journal of Bacteriology* 184, 2603–2613. <https://doi.org/10.1128/jb.184.10.2603-2613.2002>
- Trindade, S., Sousa, A., Xavier, K.B., Dionisio, F., Ferreira, M.G., Gordo, I., 2009. Positive Epistasis Drives the Acquisition of Multidrug Resistance.

PLOS Genetics 5, e1000578.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000578>

Tripathi, N., Sapra, A., 2024. Gram Staining, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Urbaniec, J., Getino, M., McEwan, T.B.-D., Sanderson-Smith, M.L., McFadden, J., Hai, F., La Ragione, R., Hassan, M.M., Hingley-Wilson, S., 2023. Anti-persister efficacy of colistin and meropenem against uropathogenic *Escherichia coli* is dependent on environmental conditions. *Microbiology* 169, 001403. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001403>

Van Camp, P.-J., Haslam, D.B., Porollo, A., 2020. Prediction of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria From Whole-Genome Sequencing Data. *Frontiers in Microbiology* 11.

Vestergaard, M., Paulander, W., Marvig, R.L., Clasen, J., Jochumsen, N., Molin, S., Jelsbak, L., Ingmer, H., Folkesson, A., 2016. Antibiotic combination therapy can select for broad-spectrum multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 47, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.09.014>

Wu, D., Jin, L., Xie, J., Liu, H., Zhao, J., Ye, D., Li, X., 2022. Inhalable antibiotic resistomes emitted from hospitals: metagenomic insights into bacterial

hosts, clinical relevance, and environmental risks. *Microbiome* 10, 19.
<https://doi.org/10.1186/s40168-021-01197-5>

Wueppenhorst, N., Stueger, H.-P., Kist, M., Glocker, E., 2009. Identification and molecular characterization of triple- and quadruple-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 648–653. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp003>

Yelin, R., Rotem, D., Schuldiner, S., 1999. EmrE, a Small *Escherichia coli* Multidrug Transporter, Protects *Saccharomyces cerevisiae* from Toxins by Sequestration in the Vacuole. *J Bacteriol* 181, 949–956.

Yu, G., Baeder, D.Y., Regoes, R.R., Rolff, J., 2018. Predicting drug resistance evolution: insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285, 20172687. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2687>

Zhang, C., Sun, R., Xia, T., 2020. Adaption/resistance to antimicrobial nanoparticles: Will it be a problem? *Nano Today* 34, 100909. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100909>

Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, T., Xu, N., Lu, T., Hong, W., Penuelas, J., Gillings, M., Wang, M., Gao, W., Qian, H., 2022. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. *Nat Commun* 13, 1553. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29283-8>

