

Reversión de la resistencia bacteriana a antibióticos en ausencia de presión selectiva

Reversão da resistência bacteriana aos antibióticos na ausência de pressão seletiva

Bacterial Antibiotic Resistance Reversal in the Absence of Selective Pressure

Josep-Ramón Codina García-Andrade, Olga Zafra Amorós

Universidad Francisco de Vitoria de Madrid.

Cita: Codina García-Andrade JR, Zafra-Amorós O. Reversión de la resistencia bacteriana a antibióticos en ausencia de presión selectiva. Rev. salud ambient. 2020; 20(2):129-136.

Recibido: 16 de julio de 2020. **Aceptado:** 28 de octubre de 2020. **Publicado:** 15 de diciembre de 2020.

Autor para correspondencia: Josep-Ramón Codina García-Andrade.

Correo e: jr.codina96@gmail.com

Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, España.

Financiación: No se ha contado con financiación para el desarrollo de este trabajo.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

Declaraciones de autoría: Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo todos los autores aprobaron la versión final.

Resumen

El abuso y el mal uso de los antibióticos como, por ejemplo, la automedicación, el abandono de tratamientos o su utilización para el engorde de animales de granja, da como resultado la aparición de bacterias patógenas resistentes o multirresistentes a antibióticos. Posiblemente, esto se deba a un exceso de presión selectiva que permite eliminar la competencia de cepas sensibles, apareciendo nuevas resistencias a antibióticos a una velocidad mayor que en la naturaleza, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) más altas y en menos tiempo que el requerido para crear nuevos fármacos. Para frenar este avance, la sensibilización, la concienciación y la bajada en el consumo parecen fundamentales. En este estudio, nos preguntamos si el control del uso de los antibióticos y, por tanto, la bajada en la presión selectiva es suficiente para que las bacterias patógenas resistentes o multirresistentes reviertan a su condición de sensibles. Para dar respuesta a esta pregunta, hemos llevado a cabo un análisis bibliográfico. Tras analizar los datos, todo parece indicar que las bacterias resistentes no van a revertir al estado de sensibles tras bajar solamente la presión selectiva debido a su gran capacidad de adaptación. Sugerimos, entre otras cosas, una mayor investigación sobre la evolución bacteriana a nivel molecular, para encontrar cuanto antes una solución a este problema.

Palabras clave: bacterias patógenas; resistencia a antibióticos; reversión; coste de aptitud; presión selectiva.

Resumo

O abuso e uso indevido de antibióticos, como por exemplo, a automedicação, o abandono de tratamentos ou o uso para engordar animais de criação, têm como resultado o aparecimento de bactérias patogénicas resistentes ou multirresistentes aos antibióticos. Provavelmente, devido ao excesso de pressão seletiva que permite eliminar a competência de cepas sensíveis, aparecendo novas resistências aos antibióticos com uma rapidez superior à que ocorre na natureza, com concentrações mínimas inibitórias (CIM) mais altas e em menos tempo do que o necessário, para a criação de novos medicamentos. Para conter este avanço é fundamental, a sensibilização, a conscientização e a diminuição do consumo. Neste estudo, questionamos se o controle do uso de antibióticos e portanto, a redução da pressão seletiva é suficiente, para que as bactérias patogénicas resistentes ou multirresistentes voltem à sua condição de sensíveis. Para responder a esta pergunta, realizamos uma análise bibliográfica. Depois de analisar os dados, tudo parece indicar que depois de baixar apenas a pressão seletiva, as bactérias resistentes não voltarão

ao seu estado sensível, devido à sua grande adaptabilidade. Sugerimos, entre outras coisas, estudos adicionais sobre a evolução bacteriana a nível molecular, para encontrar uma solução para este problema, o mais breve possível.

Palavras-chave: bactérias patogénicas; resistência a antibióticos; reversão; custo de aptidão; pressão seletiva.

Abstract

The abuse and misuse of antibiotics, such as through self-medication, treatment dropout, or cattle fattening, result in the emergence of resistant or multi-resistant pathogenic bacteria. This emergence could be due to an increased selective pressure that kills sensitive strains, new antibiotic resistances appearing at a faster rate than in nature, with higher minimum inhibitory concentrations (MICs), and than the drug discovery process. Awareness and a drop in consumption seem essential to slow down this rate of increased resistance. In this study, we asked ourselves if controlling the use of antibiotics and, hence, a drop in selective pressure are sufficient for resistant pathogenic bacteria to revert to their sensitive condition. To answer this question, we carried out a bibliographic review. The analyzed data suggests that bacteria will compensate for the fitness cost due to their high adaptive capacity. Therefore, bacterial resistance will not be reverted just by lowering the selective pressure. We suggest further research on bacterial evolution at the molecular level is necessary in order to find a solution to this problem as soon as possible.

Keywords: pathogenic bacteria; antibiotic resistance; reversal; fitness cost; selective; pressure.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Ya en 1940, poco después del descubrimiento de la penicilina, se describió como algunas bacterias habían generado una enzima para combatirla¹. Desde entonces, la aparición de patógenos resistentes ha aumentado por todo el globo a una velocidad mayor que en la naturaleza y mayor que el tiempo requerido para crear nuevos fármacos^{2,3}.

Hoy en día ya se aprecia como infecciones tales como la gonorrea, la tuberculosis, la septicemia o la neumonía son cada vez más difíciles o, en ocasiones, imposibles de tratar⁴. La OMS (Organización Mundial de la Salud) considera este problema como una amenaza mayor para el mundo⁵. Siguiendo sus recomendaciones, la Comisión Europea instó a los países miembros a implantar un Plan de Acción sobre Resistencias Antimicrobianas. En España, en el año 2014, se puso en marcha el Plan Nacional frente a la Resistencia a Antibióticos (PRAN). Estos planes de acción se basan principalmente en la bajada de la presión selectiva mediante el control del uso de antibióticos.

La adquisición de una resistencia a altos niveles de antibióticos se produce debido a un cambio en el genoma de la bacteria, ya sea mediante mutaciones o por adquisición de material genético. Las bacterias pueden llevar a cabo varios de estos procesos para resistir una mayor concentración de antibiótico o para resistir distintos tipos de antibióticos: modificación o hidrólisis del antibiótico mediante enzimas⁶; cambios en la diana del antibiótico^{3,7}; modificación de las vías de entrada y de salida del antibiótico, especialmente de las porinas y de las bombas de eflujo^{3,8-10}; cambios en el metabolismo bacteriano³. Estas adaptaciones al nuevo

entorno son parte intrínseca de las bacterias y hacen que puedan aparecer patógenos resistentes a prácticamente cualquier antibiótico disponible en la actualidad^{11,12}.

Se ha observado que las mutaciones y la adquisición de material genético móvil que tiene lugar en las bacterias para que estas se vuelvan resistentes, por lo general, tienen un coste adaptativo que se conoce como coste de aptitud (*fitness cost*)¹³⁻¹⁹. Este coste hace que la bacteria resistente pierda la competición adaptativa frente a una cepa sensible en ausencia de antibiótico. La falta de adaptación suele deberse a una menor tasa de crecimiento, pero puede ser diferente en cada especie^{20,21}. Este hecho fundamental hace que se plantee la posibilidad de reversión de las resistencias ante la bajada de presión selectiva mediante la vigilancia y la concienciación del uso de antibióticos, pero ¿es suficiente la bajada de presión selectiva para revertir la resistencia adquirida? Esta pregunta fundamental ha dado origen a esta investigación.

OBJETIVO

Comprobar, mediante un análisis bibliográfico de artículos de investigación, si la ausencia de presión selectiva es suficiente por sí sola para revertir la resistencia a antibióticos en bacterias patógenas. Esto nos permitirá dar un juicio informado sobre este asunto.

METODOLOGÍA

Durante el periodo de enero a abril de 2020 se buscaron los siguientes términos *Mesh* en la base de datos de artículos de investigación MEDLINE con la herramienta PubMed perteneciente al NHS de Estados

Unidos: *Drug Resistance, Bacterial/genetics* [Majr]; (*“Genetic Fitness”* [Mesh]) AND *“Drug Resistance, Bacterial”* [Mesh]. Además, se realizó una búsqueda de los términos libres: *“Reversal antibiotic resistance”*; *“Reversal drug resistance”*. Se utilizó una restricción a los últimos cinco años para conocer los avances más recientes sobre este tema. Se obtuvieron 5093 resultados en la primera búsqueda. La búsqueda se redujo a términos más específicos (*“Genetic Fitness”* [Mesh]) AND *“Drug Resistance, Bacterial”* [Mesh] y *“Reversal antibiotic resistance”*, de los que se obtuvieron 171 resultados tras eliminar los resultados duplicados. Estos resultados fueron filtrados manualmente por título, resumen y metodología, obteniéndose finalmente 12 resultados idóneos para esta revisión.

Con el fin de tratar y gestionar la bibliografía se empleó la herramienta informática Mendeley.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ante la premisa de que la adquisición de resistencias por parte de las bacterias conlleva un coste adaptativo, aparece la pregunta ¿es suficiente la bajada de presión selectiva para revertir la resistencia adquirida? Para tratar de dar respuesta a esta pregunta hemos llevado a cabo una revisión bibliográfica que recopila los artículos de investigación sobre esta materia publicados en los últimos cinco años. En total se han encontrado doce artículos idóneos que pueden arrojar luz sobre esta pregunta.

1. ESTUDIOS OBSERVACIONALES: REVERSIÓN DE RESISTENCIA EN CASOS PUNTALES

Por un lado, encontramos dos estudios observacionales llevados a cabo en el entorno hospitalario^{22,23}. En ambos, los investigadores vieron casos de reversión de los microorganismos resistentes hacia formas sensibles al bajar la presión selectiva.

El primer estudio es el llevado a cabo por W. Guo²², en el que se analiza la evolución de la resistencia de bacterias patógenas en un periodo de seis años (2008-2013) tras la adopción de medidas restrictivas para el control del uso de antibióticos en China. El consumo humano de antibióticos disminuyó de manera general y, como resultado se observó que el porcentaje de aislados de *P. aeruginosa* resistentes a ciprofloxacino, y de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a ceftazidima se había reducido significativamente. Sin embargo, no se observaron reducciones significativas de resistencias en el resto de las combinaciones entre organismos y antibióticos. La primera es la compensación del coste adaptativo que suponen las resistencias, y la segunda es la prevalencia de un consumo de antibióticos por encima de un umbral. La idea de sobrepasar un umbral fijo de

consumo, específico para cada especie, para adquirir la resistencia o rebajar el consumo por debajo del mismo umbral para revertir la resistencia ya fue propuesta en 1999 por Austin.

El segundo estudio que apoya esta hipótesis fue llevado a cabo en Reino Unido por A. Ledda²³. Al igual que el anterior, es un estudio observacional realizado tras la implantación de controles estrictos en el uso hospitalario de antibióticos. El equipo de Ledda secuenció el genoma de 231 aislados celulares de un linaje concreto de *Staphylococcus aureus* pertenecientes a muestras clínicas de pacientes ingleses desde 1997 a 2013 y observaron que nueve cepas derivadas del clon multirresistente ST-36-SCCmecII, habían revertido su resistencia a la meticilina entre los años 2008 y 2012. Se asoció esta reversión a la implantación de controles hospitalarios estrictos que incluían la notificación de todos los resultados positivos en cultivos con *S. aureus* multirresistentes, la asignación de responsabilidad directa sobre los jefes de servicio ante cualquier inconsistencia en los datos y la aplicación de sanciones²⁵. Medidas similares a las adoptadas en China²² argumentaron que, al reducir la presión selectiva, el coste adaptativo de la resistencia a meticilina en estas cepas era superior a su capacidad para sobrevivir, generándose una reversión de dicha resistencia; no obstante, los autores asumen que este artículo se centra en un caso muy específico.

Ambos estudios son similares, ya que son observacionales y analizan aislados clínicos tras la adopción de medidas preventivas frente a la diseminación y establecimiento de resistencias a antibióticos. En ambos países, estas medidas fueron similares, destacando dos elementos ausentes en las medidas adoptadas en España: la responsabilidad directa sobre los sanitarios y la aplicación de sanciones. Teniendo en cuenta la ausencia de estudios moleculares en el primer ensayo, la limitación a una población bacteriana muy concreta en el segundo y la cantidad total de artículos encontrados que apoyan la reversión, no podemos asumir que este proceso vaya a ocurrir de manera generalizada pese a un control estricto, y haría falta realizar más experimentos en este sentido para comprender bien cuándo y cómo se da este proceso.

2. ESTUDIOS EXPERIMENTALES: MANTENIMIENTO DE LA RESISTENCIA

Estos artículos sostienen que las resistencias se mantienen gracias a mecanismos que compensarán dicho coste de adaptación como: mutaciones compensatorias, mutaciones de adaptación general, cambios metabólicos, una transferencia génica horizontal suficientemente rápida, condiciones oligotróficas determinadas. Algunos de estos estudios proponen también que algunas resistencias podrían no suponer un coste²⁶⁻³³.

Mutaciones compensatorias y de adaptación general

En ensayos referidos a *M. tuberculosis*, el equipo de A. Maxwell²⁸ estudió las mutaciones compensatorias que se daban en la RNA polimerasa para compensar el coste adaptativo que le supone al patógeno la resistencia a rifampicina. La resistencia a rifampicina se consigue gracias a mutaciones en los genes *rpo* que codifican para la RNA polimerasa bacteriana. El equipo de Maxwell propuso que ciertas mutaciones en estos genes observadas en cepas de *M. tuberculosis* resistentes y prevalentes, podían funcionar como mutaciones compensatorias. Para demostrar esto, llevaron a cabo ensayos *in vitro* de transcripción (iniciación, elongación y terminación) en cepas con plásmidos que contenían: bien el gen de la RNA polimerasa silvestre, bien el gen de la RNA polimerasa con mutaciones en la subunidad β (*rpoB*) que confieren resistencia a rifampicina o bien el gen de la RNA polimerasa con estas mutaciones y las mutaciones consideradas como mutaciones compensatorias. Los investigadores concluyeron que, pese a existir un coste en la iniciación, elongación y terminación de la transcripción en presencia de mutaciones de resistencia a rifampicina en la RNA polimerasa de *M. tuberculosis*, existen a su vez mutaciones de compensación que justifican la alta prevalencia de esta resistencia.

El equipo de Q. Qi²⁷ estudió el comportamiento evolutivo de *P. aeruginosa*, resistente a rifampicina. Estos investigadores querían comprobar el papel de las mutaciones compensatorias y las mutaciones adaptativas generales en la persistencia de las resistencias. Para ello cultivaron ocho cepas de *P. aeruginosa* con mutaciones diferentes en el gen de resistencia a rifampicina *rpoB*, así como cepas sensibles, en medio sin rifampicina. Tras 300 generaciones observaron qué cambios evolutivos habían sufrido a través de la secuenciación del genoma completo. Observaron que cinco genes acumulaban casi el 70 % de todas las mutaciones sufridas por las cepas originalmente resistentes (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *cupE6* y *lasR*), mientras que en las cepas originalmente sensibles el 75 % de las mutaciones se acumulaban en otros cuatro genes diferentes y en *lasR*. Una de las mutaciones, en el gen *rpoB*, se dio de manera paralela en todas las cepas descendientes de las resistentes. Comprobaron que esta mutación aumenta la eficiencia energética de la transcripción con respecto a las mutaciones originales en este gen. Una de estas mutaciones compensatorias observadas (también en el gen *rpoB*) resultó, curiosamente, en la reversión de la resistencia en lugar de en el mantenimiento de esta, sin embargo, solo ocurrió en un caso. Las mutaciones más comunes fueron las mutaciones en el gen *lasR*, un gen que regula la transcripción y que está estrechamente ligado al proceso de percepción de quórum. Estas mutaciones resultaban principalmente en una pérdida de la función de dicho gen, lo que les confería una mejor adaptación. Al encontrarse estas mutaciones en las cepas originalmente

sensibles no podían clasificarse como mutaciones compensatorias, por ello se consideran mutaciones adaptativas generales. Los autores concluyeron que, aunque las mutaciones compensatorias tienen gran importancia en la adaptación de *P. aeruginosa* resistente a rifampicina (especialmente si el coste adaptativo que estas conllevan es alto), no se pueden dejar de lado las mutaciones adaptativas generales como las mutaciones en el gen *lasR* que ayudan a la adaptación de bacterias con una resistencia menos costosa.

Moura de J. Sousa³⁰ propone que, un escenario probable es que tras la exposición a un antibiótico, aparezcan bacterias resistentes pero no necesariamente con la misma mutación. En su estudio pretende comprobar qué mutaciones son más o menos costosas, y cómo pueden prevalecer en el tiempo pese a este coste. Para ello, compararon diferentes cepas de *E. coli* con diferentes mutaciones de resistencia. El primer conjunto de cepas que compararon incluía tres clones con mutaciones diferentes que conferían resistencia al mismo antibiótico, la rifampicina. El segundo conjunto de cepas incluía dos clones con mutaciones diferentes que conferirán resistencias a diferentes antibióticos, en este caso a rifampicina y a estreptomina. A todas las cepas se les introdujo un gen de fluorescencia para, más tarde, poder cuantificarlas. Las cepas se cultivaron durante un mes, periodo en el que hubo 280 generaciones. Observaron que, pese a existir diferencias en el coste adaptativo de las diferentes mutaciones, las cepas podían coexistir y sobrevivir durante todo el periodo que duró el experimento. Los autores justifican esto por la aparición de mutaciones compensatorias más beneficiosas en las cepas con mutaciones más costosas. Para comprobar esta hipótesis llevaron a cabo una secuenciación del genoma completo de dos cepas que prevalecieron durante todo el experimento pese a tener alelos de resistencia con costes muy diferentes. Tras la secuenciación observaron que se habían desarrollado mutaciones compensatorias, y que estas eran diferentes entre las dos cepas. Los autores concluyeron que las resistencias podían mantenerse en el tiempo gracias a la aparición de mutaciones compensatorias que tendrían un efecto más beneficioso si el coste adaptativo era más alto. Además, comprobaron que diferentes mutaciones de resistencia pueden coexistir durante muchas generaciones pese a tener diferente coste adaptativo.

Dos años más tarde, Moura de Sousa quiso probar que la aparición de una mayor compensación cuanto mayor es el coste se daba en condiciones más extremas³¹. En este caso compararon la aparición de mutaciones compensatorias en bacterias resistentes frente a bacterias multirresistentes. Para ello, emplearon cepas de *E. coli* resistentes a rifampicina, a estreptomina y a ambas a la vez. La resistencia doble consistía en unir las dos mismas mutaciones que las resistencias simples, por lo que los clones multirresistentes tenían un coste

mayor asociado a sus resistencias. Cultivaron cada uno por separado en las mismas condiciones, sin antibiótico. Midiendo la frecuencia de la señal fluorescente de cada clon vieron que los clones multirresistentes se adaptaron en tan solo cuatro días (mayor señal fluorescente, y por tanto mayor crecimiento a partir de ese día), mientras que los resistentes simples aumentaron su frecuencia de fluorescencia tras ocho-diez días de cultivo. Observaron que la tasa de mutación de cada cepa para descartar que el efecto se debiese a distinta frecuencia de mutación. Los clones multirresistentes adquirieron un tipo de mutaciones y los clones con resistencia simple otras.

Cambios en el metabolismo

Pacheco, describió como unas cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes gracias a la sobreexpresión de bombas de eflujo RND (*resistance-nodulation-cell-division*), mantenían su resistencia debido a un cambio en su metabolismo. La sobreexpresión de bombas de eflujo suponía un gasto considerable de energía, además de bajar peligrosamente el pH intracelular por funcionar mediante un antiporte protón/substrato. Al llevar a cabo varios estudios de competición con cepas silvestres observaron que, las cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes que persistieron, lo hicieron mediante una compensación metabólica. Estas habían aumentado la tasa de respiración aerobia que expulsa protones aumentando el pH y generando energía. Al consumir tanto oxígeno, se generaría un microambiente anaeróbico lo que fomentaría la respiración anaeróbica consumiendo nitrato y produciendo más energía. Esta adaptación serviría para mantener la resistencia en medio rico en oxígeno y nitrato, sin embargo, al hacer el ensayo de competición en medio pobre en estos compuestos, pudieron apreciar un coste adaptativo asociado a las cepas multirresistentes.

El equipo de C. Charissa²⁹ realizó una secuenciación completa del genoma de alguna de las cepas clínicas resistentes más comunes de *M. tuberculosis*, así como variantes sensibles de las mismas. La secuenciación masiva reveló dos cosas, en primer lugar, la gran variabilidad existente entre cepas que puede dar lugar a fisiologías muy diversas con más o menos capacidad de asumir costes de adaptación y, en segundo lugar, que la mayoría de las mutaciones encontradas eran mutaciones puntuales. De hecho, los autores clasificaron funcionalmente los genes afectados por mutaciones puntuales e, independientemente de la cepa, un amplio porcentaje pertenecía a genes relacionados con la pared celular, metabolismo intermediario y la respiración (así como un amplio porcentaje de genes hipotéticos). Además, compararon el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos y en células pulmonares de ratón y vieron que las cepas más resistentes y con el menor coste de adaptación eran también las más transmisibles. Los autores deducen, que la multirresistencia de alguna

de las cepas se puede deber más a un cambio en el metabolismo y mutaciones que lo compensan que a genes de resistencia como tal.

Transferencia génica horizontal

Otro mecanismo por el que las bacterias resistentes pueden persistir en un ambiente sin presión selectiva es la transferencia génica horizontal, como propuso A. Lopatkin³³. Se basó en que un plásmido se mantendrá siempre que la conjugación sea lo suficientemente rápida comparada con la tasa de pérdida del plásmido y con el coste de este. En su modelo, el coste no tenía mucho peso y, si la conjugación se daba lo suficientemente rápido con respecto a la pérdida, se podría asumir este coste. Para comprobarlo, usaron ocho plásmidos que pertenecían a seis grupos de incompatibilidad diferentes cubriendo los plásmidos más comunes en enterobacterias. Además, usaron tres plásmidos conjugativos aislados de muestras clínicas. Cada plásmido presentaba un coste diferente. Los introdujeron en la misma cepa de *E. coli*. Cada clon con un plásmido distinto se cultivó con un clon sin plásmido y en un medio sin antibiótico con el fin de comprobar si cada tipo de plásmido se mantenía tras un periodo de 20 días. Pasado este tiempo, todos los plásmidos se mantuvieron, incluso los más costosos. Mediante experimentos con un sistema de plásmidos con o sin origen de transferencia y un plásmido auxiliar con la maquinaria de conjugación, comprobaron que esta forma de transferencia génica horizontal era un elemento fundamental en este resultado. Estas conclusiones llevan a plantearse que, además de la bajada de presión selectiva, sería interesante estudiar procesos que bloqueen la conjugación para así frenar la transmisión horizontal de resistencias.

Condiciones oligotróficas

W. Lin³² propuso que las condiciones oligotróficas podían estar jugando un papel importante en la persistencia de las resistencias. Para comprobarlo, su equipo llevó a cabo varios ensayos de competición en los que se comparaba el crecimiento de cepas resistentes a rifampicina con el crecimiento de cepas sensibles a rifampicina, en ausencia de antibiótico y con diferentes condiciones nutricionales. Las cepas resistentes que emplearon fueron *E. coli* K12 con una mutación en el gen *rpoB* y *P. aeruginosa* PAO1 con el mismo gen mutado. Cada cepa resistente se mezcló con su correspondiente cepa sensible en la misma cantidad y fueron cultivadas en medio sin antibióticos y con diferentes concentraciones nutricionales. Los investigadores pudieron observar un mayor porcentaje de resistentes en condiciones nutricionales pobres. W. Lin y su equipo sugieren que esto puede ser la causa de la persistencia de bacterias resistentes en medios con baja cantidad de nutrientes y sin presión selectiva, como puede ser el agua corriente. Además, mediante secuenciación, fueron capaces de observar que, en *E. coli* resistente, se habían desarrollado

mutaciones compensatorias en el gen que le confería la resistencia (*rpoB*). Las conclusiones sacadas por W. Lin llevan a plantearse la necesidad de saber si las infecciones y los fómites hospitalarios representan medios ricos o pobres. En cuanto a las infecciones es difícil establecer un parámetro, ya que pueden ser en lugares muy diversos del cuerpo. Los fómites también pueden ser variados, pero las condiciones serán en su mayoría pobres. Dado que habrá ocasiones en las que tanto infecciones como fómites serán ambientes pobres, y si las conclusiones sacadas por W. Lin son correctas, habría que replantear los experimentos en los que se llevan a cabo ensayos de competición en medios ricos por arrojar datos artificiales.

Resistencia sin coste adaptativo

Algunos ensayos han tratado de comprobar si las resistencias que permanecen lo hacen siempre gracias a mecanismos compensatorios como acabamos de ver, o bien, si la adquisición de resistencias puede, en algunas ocasiones, no suponer un coste adaptativo. En 2015, G. Chevereau³⁴ llevó a cabo un ensayo para ver qué relación existía entre el coste de una resistencia y la concentración de antibiótico que había en el medio, para el patógeno *E. coli*. Utilizaron un total de 3 985 clones con diferentes delecciones que representaban las posibles mutaciones de resistencia. Expusieron a estos clones a diferentes concentraciones de ocho antibióticos que representaban los principales grupos terapéuticos. Observaron que los clones resistentes, por lo general, crecían mejor que los sensibles cuando se iba aumentando la concentración de antibiótico. Sin embargo, lo interesante para nuestra revisión es que algunas de estas cepas crecían de la misma manera que la cepa silvestre en medio sin antibiótico. Esto supondría la existencia de mutaciones no costosas y que, por lo tanto, no requerirían de mecanismos compensatorios para persistir.

H. Lofton³⁵ estudió el coste que le suponía a *Salmonella typhimurium* la resistencia frente a los péptidos antimicrobianos. Analizó diferentes mutantes resistentes que cultivó con una cepa sin mutar en medio mínimo. Un porcentaje de estos mutantes crecieron de manera similar a la cepa silvestre. Determinó también la capacidad de supervivencia durante un largo periodo con una baja concentración de nutrientes, manteniendo una fase estacionaria durante 35 días. En este ensayo todos los mutantes resistentes presentaron una curva de supervivencia igual a la del silvestre. Concluyó que las resistencias a péptidos antimicrobianos por parte de *S. typhimurium* no necesariamente tenían que suponer un coste adaptativo. En este caso, también es importante resaltar que los autores no secuencian el genoma antes y después de los 35 días en estacionaria por lo que no se puede descartar la aparición de mutaciones compensatorias, al igual que en el artículo explicado antes de G. Chevereau³⁴.

3. ANÁLISIS CRÍTICO

Estos estudios establecen una evidencia clara de que las bacterias pueden sufrir diferentes mecanismos de adaptación que compensen el coste de las resistencias en ausencia de presión selectiva. No obstante, hay que recordar que estos artículos se centran en cuatro especies *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*, y muchos estudian la resistencia a un antibiótico, la rifampicina. Tanto las especies como el antibiótico son de gran relevancia en clínica, pero harían falta más estudios con diferentes especies y más tipos de antibióticos para poder afirmar de manera rotunda que es un proceso generalizado. Además, como hemos comentado, en un estudio se dio una mutación compensatoria que supuso la reversión de la resistencia. Si bien sería interesante investigar por qué ha ocurrido esto, el caso es aislado y no supone una evidencia suficiente para establecer que la ausencia de la presión selectiva generará la reversión a las resistencias.

La OMS, y por tanto el PRAN, pretenden controlar el uso de antibióticos para reducir así la presión selectiva. Esto, sin duda, evitaría la rápida aparición de nuevas resistencias y, además, no facilitará la persistencia de las existentes. Sin embargo, no es un punto final, puesto que todo apunta a que el coste que implica la adquisición de resistencias es superado en la mayoría de los casos por diversos mecanismos que dependen de la gran capacidad de evolución bacteriana. Para tratar de evitar la prevalencia de las resistencias podría ser una opción, por ejemplo, tratar de suprimir la transferencia génica horizontal³³. Además, se han descubierto resultados prometedores a través de estudios tanto *in vivo* como *in silico* relacionados con la secuencia de administración de los antibióticos³⁶⁻³⁸. Una simulación llevada a cabo en 2015 por D. Nichol estima que cerca del 70 % de las secuencias de administración que seguimos hoy en día dan lugar, en última instancia, a la aparición de resistencias³⁶. De especial relevancia son los resultados obtenidos por Yoshida M, en los que se demuestra que la secuencia de antibióticos puede, no solo prevenir la aparición de resistencias, sino también revertirlas³⁸.

CONCLUSIÓN

Las reversiones de las resistencias de cepas clínicas tras el control sobre el uso de antibióticos son muy puntuales y no se han estudiado los mecanismos moleculares implicados, por lo que podríamos considerarlo excepcional. El coste adaptativo de la resistencia a antibióticos se puede compensar mediante nuevos cambios en el genoma, ya sean cambios metabólicos generales (compensación por mejora de la adaptación general), cambios específicos en los genes de resistencia o por una tasa de transferencia génica horizontal suficientemente rápida. La ausencia de presión selectiva

parece ser insuficiente para revertir las resistencias por sí sola. Los ensayos de adaptación (*fitness*) que se realizan deberían repetirse en condiciones de restricción de nutrientes para valorarlos en condiciones más parecidas a las reales. Conviene tener en cuenta otras vías de abordar este problema como puede ser el estudio de la secuencia de administración de antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev. Infect. Dis.* 1940;10(4):677-8. doi:10.1038/146837a0.
- Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature.* 2016; 529(7586):336-43. doi:10.1038/nature17042.
- Munita J, Arias C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2). doi:10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015.
- Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. [citado el 3 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>.
- Organización Mundial de la Salud. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. WHO. [citado el 14 de abril de 2020] Disponible en: <https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>.
- Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(10). doi:10.1128/AAC.01076-18.
- Negi SS, Singh U, Gupta S, Khare S, Rai A, Lal S. Characterization of RPO B gene for detection of rifampicin drug resistance by SSCP and sequence analysis. *Indian J. Med. Microbiol.* 2009; 27(3):226-30. doi:10.4103/0255-0857.45364.
- Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008; 6(12):893-903. doi:10.1038/nrmicro1994.
- Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56(1):20-51. doi:10.1093/jac/dki171.
- Piédrola Angulo G. Las bombas de expulsión activa en la resistencia a los antimicrobianos. Real Academia Nacional de Medicina de España. [citado el 23 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.ranm.es/2001/145-sesion-del-dia-20-de-marzo-del-2001.html?start=1>. Published 2001.
- Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3(9):711-21. doi:10.1038/nrmicro1234.
- Lerminiaux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J. Microbiol.* 2019; 65(1):34-44. doi:10.1139/cjm-2018-0275.
- Salvatore PP, Becerra MC, Abel zur Wiesch P, et al. Fitness Costs of Drug Resistance Mutations in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis: A Household-Based Case-Control Study. *J. Infect. Dis.* 2016; 213(1):149-55. doi:10.1093/infdis/jiv347.
- Kodio O, Georges Togo AC, Sadio Sarro YD, et al. Competitive fitness of Mycobacterium tuberculosis in vitro. *Int. J. Mycobacteriology.* 2019; 8(3):287-91. doi:10.4103/ijmy.ijmy_97_19.
- Singh A, Singh S, Singh J, Rahman M, Pathak A, Prasad KN. Survivability and fitness cost of heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus. *Indian J. Med. Microbiol.* 2017; 35(3):415-6. doi:10.4103/ijmm.IJMM_17_311.
- Praski Alzrigat L, Huseby DL, Brandis G, Hughes D. Fitness cost constrains the spectrum of marR mutations in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017; 72(11):3016-24. doi:10.1093/jac/dkx270.
- Colicchio R, Pagliuca C, Pastore G, et al. Fitness cost of rifampin resistance in *Neisseria meningitidis*: In Vitro study of mechanisms associated with rpoB H553Y mutation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(12):7637-49. doi:10.1128/AAC.01746-15.
- Rifat D, Campodónico VL, Tao J, et al. In vitro and in vivo fitness costs associated with Mycobacterium tuberculosis RpoB mutation H526D. *Future Microbiol.* 2017; 12(9):753-65. doi:10.2217/fmb-2017-0022.
- Suzuki S, Horinouchi T, Furusawa C. Phenotypic changes associated with the fitness cost in antibiotic resistant *Escherichia coli* strains. *Mol. Biosyst.* 2016; 12(2):414-20. doi:10.1039/c5mb00590f.
- Pourbaix A, Guérin F, de Lastours V, et al. Biological cost of fosfomycin resistance in *Escherichia coli* in a murine model of urinary tract infection. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017; 307(8):452-9. doi:10.1016/j.ijmm.2017.09.019.
- Stepanyan K, Wenseleers T, Duéñez-Guzmán EA, et al. Fitness trade-offs explain low levels of persister cells in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Ecol.* 2015; 24(7):1572-83. doi:10.1111/mec.13127.
- Guo W, He Q, Wang Z, et al. Influence of antimicrobial consumption on gram-negative bacteria in inpatients receiving antimicrobial resistance therapy from 2008-2013 at a tertiary hospital in Shanghai, China. *Am J. Infect. Control.* 2015; 43(4):358-64. doi:10.1016/j.ajic.2014.12.010.
- Ledda A, Price JR, Cole K, et al. Re-emergence of methicillin susceptibility in a resistant lineage of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017; 72(5):1285-8. doi:10.1093/jac/dkw570.
- Austin DJ, Kristinsson KG, Anderson RM. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999; 96(3):1152-6. doi:10.1073/pnas.96.3.1152.
- Johnson AP, Davies J, Guy R, et al. Mandatory surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia in England: the first 10 years. doi:10.1093/jac/dkr561.
- Pacheco JO, Alvarez-Ortega C, Rico MA, Martínez JL. Metabolic compensation of fitness costs is a general outcome for antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants overexpressing efflux pumps. *Am. Soc. Microbiol. mBio.* 2017; 8(4). doi:10.1128/mBio.00500-17.
- Qi Q, Toll-Riera M, Heilbron K, Preston GM, Maclean RC. The genomic basis of adaptation to the fitness cost of rifampicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 2016; 283(1822). doi:10.1098/rspb.2015.2452.
- Stefan MA, Ugur FS, Garcia GA. Source of the fitness defect in rifampicin-resistant mycobacterium tuberculosis RNA polymerase and the mechanism of compensation by mutations in the β subunit. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(6). doi:10.1128/AAC.00164-18.
- Naidoo CC, Pillay M. Fitness-compensatory mutations facilitate the spread of drug-resistant F15/LAM4/KZN and F28 Mycobacterium tuberculosis strains in KwaZulu-Natal, South Africa. *J. Genet.* 2017; 96(4):599-612. doi:10.1007/s12041-017-0805-8.

30. Moura de Sousa J, Sousa A, Bourgard C, Gordo I. Potential for adaptation overrides cost of resistance. *Future Microbiol.* 2015;10(9):1415-31. doi:10.2217/fmb.15.61.
31. Moura de Sousa J, Balbontín R, Durão P, Gordo I. Multidrug-resistant bacteria compensate for the epistasis between resistances. *PLoS Biol.* 2017; 15(4). doi:10.1371/journal.pbio.2001741.
32. Lin W, Zeng J, Wan K, et al. Reduction of the fitness cost of antibiotic resistance caused by chromosomal mutations under poor nutrient conditions. *Environ. Int.* 2018; 120(March):63-71. doi:10.1016/j.envint.2018.07.035.
33. Lopatkin AJ, Meredith HR, Srimani JK, Pfeiffer C, Durrett R, You L. Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nat. Commun.* 2017; 8(1):1689. doi:10.1038/s41467-017-01532-1.
34. Chevereau G, Dravecká M, Batur T, et al. Quantifying the Determinants of Evolutionary Dynamics Leading to Drug Resistance. *PLoS Biol.* 2015; 13(11). doi:10.1371/journal.pbio.1002299.
35. Lofton H, Anwar N, Rhen M, Andersson DI. Fitness of salmonella mutants resistant to antimicrobial peptides. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015; 70(2):432-40. doi:10.1093/jac/dku423.
36. Nichol D, Jeavons P, Fletcher AG, et al. Steering Evolution with Sequential Therapy to Prevent the Emergence of Bacterial Antibiotic Resistance. *PLoS Comput. Biol.* 2015; 11(9). doi:10.1371/journal.pcbi.1004493.
37. Kriegeskorte A, Lorè NI, Bragonzi A, et al. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are induced by trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and have increased fitness during SXT challenge. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(12):7265-72. doi:10.1128/AAC.00742-15.
38. Yoshida M, Reyes SG, Tsuda S, Horinouchi T, Furusawa C, Cronin L. Time-programmable drug dosing allows the manipulation, suppression and reversal of antibiotic drug resistance in vitro. *Nat. Commun.* 2017; 8. doi:10.1038/ncomms15589.