



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA A
DESINFECTANTES EN BACTERIAS AISLADAS DE
PACIENTES CON INFECCIONES EN EL TRACTO
URINARIO.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Daniela Andrea de la Santísima Trinidad
Gómez García como requisito parcial
para optar por el título de Licenciada en
Biología

Tutora: Prof. Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA
FEBRERO 2013

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mi familia, por su amor, su apoyo incondicional, su comprensión y su confianza, siempre manteniéndome fuerte frente a los obstáculos que encontré en el camino para cumplir esta meta.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le agradezco a Dios por permitirme cumplir esta meta.

Le agradezco a mi familia, por apoyarme siempre, mis Padres que siempre confiaron en mi y con su amor facilitaron el cumplimiento de este sueño, a mi Madrina Nancy y mi Tía Yettsi que durante estos años fueron mis mamás, gracias por preocuparse por mi y quererme cada día, a mi prima Manuela que me apoyó y ayudó en todo momento, a mi tía Francys, mi tío Paulo y sus hijos, Paola y Gabriel que alegraron mi vida con sus risas y juegos. A mis hermanos Dalila, Cecilio Andrés, Andrés Avelino y Betania por sus consejos, cariño, apoyo y comprensión, son los mejor del mundo. A mis abuelos, Estilita y Andrés gracias por amarme y malcriarme siempre. A mis tías Famelisa, Nurys, Mirna, Yuttsi y Belkis y a sus hijos, que aunque están lejos siempre estuvieron conmigo apoyándome y orgullosos de mis logros, a todos los amo con todo el corazón, muchas gracias.

Le agradezco a la Profe Mina, que durante este tiempo fue una madre para mi, gracias por sus enseñanzas, correcciones y regaños, por ser una tutora excelente y una profesional inigualable.

Le agradezco a mis compañeros del sótano Yusibeska, Indira, Beatriz y Giovanni que me enseñaron, me hicieron reír y ayudaron en todo momento.

Mis amigas Ruth y Emily compañeras increíbles y amigas sin igual, mis amigos David, Mariana, Maye, Xol, gracias por los consejos, las risas, las lágrimas los buenos ratos los quiero muchísimo, compañeros con los que compartí cada clase, casa laboratorio cada momento ¡¡¡GRACIAS!!!.

Mi novio Omar León, gracias por apoyarme, ayudarme, quererme, cuidarme, consolarme y siempre sacarme una sonrisa. Muchas Gracias Vida!!

Gracias a todas las personas que me ayudaron y apoyaron siempre en el cumplimiento de esta meta.

Muchas Gracias...

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	1
1.2 Infecciones del tracto urinario (ITU).....	4
1.3 Biocidas	8
1.3.1 Clasificación de los biocidas.....	9
1.3.2 Clasificación de los desinfectantes.....	10
1.3.3 Mecanismo de acción de los antisépticos y desinfectantes.	10
1.3.4 Factores que afectan la actividad de los desinfectantes.....	15
1.3.5 Compuestos de amonio cuaternario.....	16
1.3.2 Hipoclorito de sodio.....	22
1.4 Resistencia bacteriana a los biocidas.	25
1.4.1 Resistencia intrínseca.....	26
1.4.2 Resistencia adquirida.....	28
1.4.3 Factores contribuyen a la resistencia bacteriana a los biocidas.....	30
1.5 Bombas de eflujo.	32
1.5.1 Familias de bombas de eflujo.....	34
1.5.2 Mecanismos de acción de las bombas de eflujo.....	40
2. ANTECEDENTES	42
2.1 Estudios a nivel internacional.	43
2.2 Estudios a nivel nacional.	51
3. JUSTIFICACIÓN	54
4. OBJETIVOS.....	56
Objetivo general.....	56
Objetivos específicos.....	56
5. PLAN DE TRABAJO.....	57

6. MATERIALES Y MÉTODOS	58
6.1 Cepas.	58
6.2 Reactivos.	59
6.3 Desinfectantes.....	59
6.4 Neutralizante.	59
6.5 Determinación del fenotipo de resistencia.....	60
6.5.1 Protocolo de la prueba de rapidez de muerte celular.....	60
6.5.2 Protocolo de la prueba de suspensión cuantitativa.	60
6.6 Aislamiento de ADN genómico de los cultivos bacterianos.....	62
6.7 Detección de genes que codifican para bombas de eflujo.....	63
6.7.1 Condiciones de la reacción de PCR.....	64
6.8 Electroforesis en geles de agarosa.....	66
6.8.1 Visualización del gel.....	66
6.8.2 Registro de la imagen del gel.	66
7. RESULTADOS	67
7.1 Comprobación de fenotipos.	67
7.2 Determinación del fenotipo de resistencia.....	67
7.3 Amplificación de los genes que codifican para bombas de eflujo.....	73
8. DISCUSIÓN	82
8.1 Resistencia a los desinfectantes evaluados.....	84
8.2 Evaluación de genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario mediante PCR	91
9. CONCLUSIONES	97
10. RECOMENDACIONES.....	98
8. BIBLIOGRAFÍA.....	99

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I: Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	3
Tabla II: Resumen de mecanismos de acción antibacteriana de antisépticos y desinfectantes.....	14
Tabla III: Posibles mecanismos de resistencia a desinfectantes codificados en plásmidos.....	30
Tabla IV: Mecanismos de resistencia bacteriana a biocidas.....	31
Tabla V: Clasificación de los transportadores MDR presentes en <i>E. coli</i>	40
Tabla VI: Cepas de <i>E. coli</i> evaluadas y fenotipo de resistencia a antibióticos.....	58
Tabla VII: Desinfectantes evaluados.....	59
Tabla VIII: Nombre, secuencia y tamaño de los iniciadores de los genes <i>qac</i> que codifican para bombas de eflujo.....	63
Tabla IX: Reactivos utilizados en PCR.....	65
Tabla X: Condiciones de amplificación de los genes <i>qac</i>	65
Tabla XI: Control de toxicidad del neutralizante.....	68
Tabla XII: Control de neutralización de los desinfectantes a las diluciones evaluadas.....	69
Tabla XIII: Prueba de rapidez de muerte celular con QAC diluido al 10%.....	70
Tabla XIV: Prueba de rapidez de muerte celular con QAC al 100%.....	71
Tabla XV: Prueba de rapidez de muerte celular con cloro diluido al 5% y al 10%.....	72
Tabla XVI: Título bacteriano antes y después de la exposición al desinfectante y Valores de Log10 de la reducción de la viabilidad en presencia de QAC producto comercial diluido al 10%.....	73
Tabla XVII: Resultados obtenidos al estudiar el fenotipo de resistencia a los desinfectantes evaluados y la presencia o ausencia de los genes que codifican bombas de eflujo de resistencia a los QAC.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: <i>Escherichia coli</i> micrografía electrónica.....	2
Figura 2: Factores que condicionan las enfermedades infecciosas.....	4
Figura 3: Estructura de los compuestos de amonio cuaternario.....	17
Figura 4: Representación de la cadena larga hidrófoba en la molécula de amonio cuaternario.....	19
Figura 5: Mecanismo de acción de los biocidas de amonio cuaternario.....	20
Figura 6: Estructura química del Bromuro de Lauril Dimetil Bencil.....	22
Figura 7: Estructura del hipoclorito de sodio	23
Figura 8: Diagrama de comparación de las 5 familias de bombas de eflujo.....	36
Figura 9: Representación esquemática de la estructura y función de los sistemas de eflujo RND en bacterias Gram negativas.....	39
Figura 10: Fotografía de tubos de ensayo de la prueba de rapidez de muerte celular.....	70
Figura 11: Registro fotográfico de una corrida electroforética de los productos de PCR del gen que codifica una región conservada de ARN ribosomal 16S.....	74
Figura 12: Registro fotográfico de una corrida electroforética de los productos de PCR del gen <i>qacB</i>	75
Figura 13: Registro fotográfico de una corrida electroforética de los productos de PCR del gen <i>qacEΔ1</i>	76
Figura 14: Registro fotográfico de una corrida electroforética de los productos de PCR del gen <i>qacG</i>	77
Figura 15: Registro fotográfico de una corrida electroforética de los productos de PCR del gen <i>qacH</i>	78
Figura 16: Registro fotográfico de una corrida electroforética de los productos de PCR del gen <i>qacJ</i>	79
Figura 17: Representación esquemática de la estructura básica de un integrón.....	94

ABREVIATURAS

Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Ácido Ribonucleico ribosomal	rRNA
Ampicilina	AMP
Association of Official Analytical Chemist	AOAC
Bromuro de lauril dimetil bencil amonio	LDBAB
Centro Médico Docente La Trinidad	CMDLT
Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos	CVCM
Compuesto de amonio cuaternario	QAC
Concentración Mínima Inhibitoria	CMI
<i>Dexosi-nucleotidos trifosfato</i>	dNTPs
Familia de casete de unión al ATP	ABC
Familia de extrusión de multifármacos y tóxicos	MATE
Familia de resistencia a división por nodulación	RND
Familia de resistencia a multifármacos pequeños	SMR
Histidina	His
Infecciones del Tracto Urinario	ITU
Instituto de Biología Experimental	IBE
Laboratorio de Biología de Plásmidos	LBP
Lactosa	Lac
Medio Luria-Bertani	LB
Fuerza protón motriz	PMF
Prolina	Pro
Reacción en Cadena de la Polimerasa	PCR
Resistencia a múltiples drogas	MDR
Resistente	R
Rifampicina	RIF
Sensible	S
Superfamilia del facilitador principal	MFS
Trimetoprim/Sulfametoxazol	SXT
Triptofáno	Tri
Tris/Borato/EDTA	TBE
Unidades formadoras de colonias	UFC

RESUMEN

Escherichia coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo y coliforme, y algunas cepas pueden ser causantes de infecciones. Es el patógeno que causa con mayor frecuencia infecciones en el tracto urinario.

Los desinfectantes son biocidas que se usan sobre objetos inanimados o en superficies. Entre los desinfectantes más usados se encuentran los compuestos de amonio cuaternario y el cloro. El primero tiene mayor uso en centros de salud y tiene como blanco de acción a la membrana celular, mientras el cloro es un agente oxidante, con poder de oxidación de los átomos de oxígeno libres, y es de mayor uso en el área doméstica. Sin embargo, en la actualidad se ha reportado un aumento en la resistencia de los microorganismos a diversos agentes antimicrobianos. El objetivo planteado en este trabajo es determinar el fenotipo de resistencia a los desinfectantes, en muestras de *Escherichia coli* aisladas de pacientes ambulatorios, que presentaban infecciones en el tracto urinario, y estimar la presencia de genes que codifican para bombas de eflujo como las posibles responsables del fenotipo de esta resistencia.

La metodología que se empleó para determinar el fenotipo de resistencia fue la prueba de rapidez de muerte celular y la prueba de suspensión cuantitativa, y la evaluación de la presencia de los genes que codifican para bombas de eflujo se realizó mediante la técnica de PCR.

Los resultados demuestran que el neutralizante empleado no es tóxico para las cepas en estudio y es capaz de inhibir el efecto de los desinfectantes. Al evaluar el compuesto de amonio cuaternario diluido al 10% se observó que, de las 16 cepas estudiadas, 1 cepa presentó fenotipo de resistencia, 3 cepas crecieron luego de la exposición al desinfectante, estas células pudieran ser células persistentes, y 12 fueron sensibles. Con el mismo producto sin diluir, el 100% de las cepas es sensible. Con el cloro comercial diluido al 5% y 10%, el 100% de las cepas resultaron sensibles. De los genes que codifican para bombas de eflujo, sólo se obtuvo resultado positivo para el gen *qacEΔ1*, amplificándose en las 4 cepas que mostraron crecimiento luego de la exposición al QAC al 10%.

Los resultados fenotípicos parecen indicar que las cepas estudiadas no provienen de ambientes con una presión selectiva alta, ya que se mantienen sensibles a ambos agentes. Además nos permiten sugerir que la bomba de eflujo codificada por el gen *qacEΔ1* sea la responsable de la resistencia exhibida por estas células ante el agente desinfectante ensayado.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Familia *Enterobacteriaceae*

Los bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* son los microorganismos más frecuentemente hallados en el laboratorio de microbiología clínica (Koneman y col., 1983). Se caracterizan fenotípicamente por ser Gram negativos, no esporulados, no móviles o si lo son es por flagelos, anaerobios facultativos, oxidasa negativos, con requerimientos nutricionales relativamente simples y fermentan azúcares con diversos productos finales (Madigan y col., 2002).

La familia *Enterobacteriaceae* comprende microorganismos que se caracterizan bioquímicamente porque fermentan la glucosa y reducen los nitratos a nitritos. Esta familia consta de 15 géneros que forman varios grupos muy relacionados (García, 2002, en línea).

Las enterobacterias se pueden recuperar en infecciones de virtualmente todos los sitios anatómicos, y el microbiólogo debe estar preparado para aislar estos organismos a partir de cualquier material enviado al laboratorio (Koneman y col., 1983).

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia* (figura 1). Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, y se le considera un microorganismo de flora

normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002).

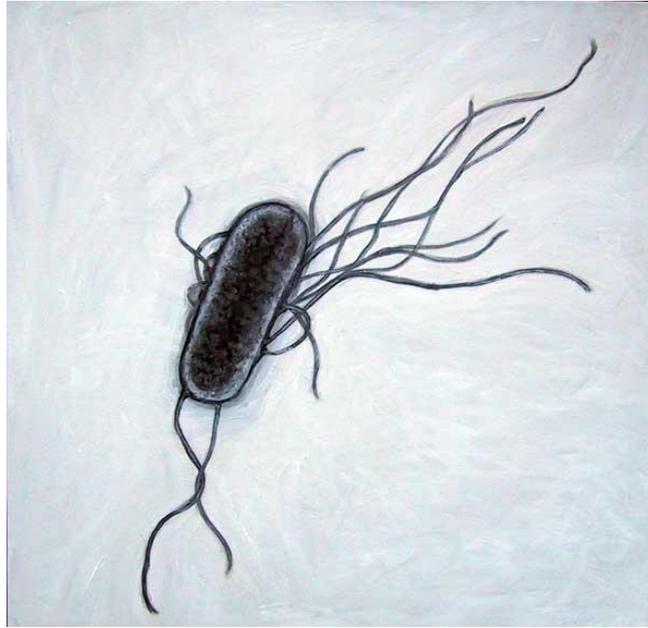


Figura 1: *Escherichia coli*: micrografía electrónica (tomado y modificado <http://jindetres.blogspot.com/2011/01/adversarios-temibles.html> consultado 01/02/2012).

La identificación de los microorganismos generalmente se lleva acabo mediante pruebas bioquímicas. En la tabla I se muestran algunas de las pruebas bioquímicas más comunes, y el resultado de éstas al identificar microorganismos pertenecientes a las especie *Escherichia coli*.

Tabla I: Identificación bioquímica de *Escherichia coli*

Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Ácido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95
Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0
Nitrato a nitrito	100
Utilización de Acetato	90
Lipasa (aceite de maíz)	0
DNasa a 25 °C	0

% positividad, significa el porcentaje reportado de *E. coli* que produce una respuesta positiva a la prueba bioquímica referida (Tomado y modificado de Rodríguez, 2002).

La mayoría de las cepas de *E. coli*, al ser coliformes, no son patógenas en el intestino, y solo las cepas productoras de enterotoxinas son de importancia clínica. En el hombre, estas bacterias pueden tener un papel como agente patógeno oportunista, causante de infecciones (Koneman y col., 1983). Entre las infecciones que principalmente causa este microorganismo, las más frecuentes son las urinarias, pero origina también las infecciones de las vías biliares, peritonitis, neumonía, meningitis neonatal y gastroenteritis, entre otras. La emigración desde el ano a la región periuretral, con ulterior ascenso de los gérmenes por la uretra

hasta la vejiga urinaria, es la patogenia más habitual de las infecciones urinarias colibacilares. *E. coli* es responsable de casi todas (más del 90%) de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad (García, 2002, en línea).

1.2 Infecciones del tracto urinario (ITU).

Las enfermedades infecciosas son el resultado de la interacción entre los microorganismos, el hospedero humano y el medio ambiente (figura 2). La capacidad de los microorganismos de causar infección mediante sus factores virulentos, la capacidad inmune del hospedero para defenderse y su susceptibilidad genética, el medio ambiente con sus factores físicos, culturales y económicos, son determinantes en la frecuencia, el predominio o el control de las enfermedades infecciosas (Restrepo y col., 2003).

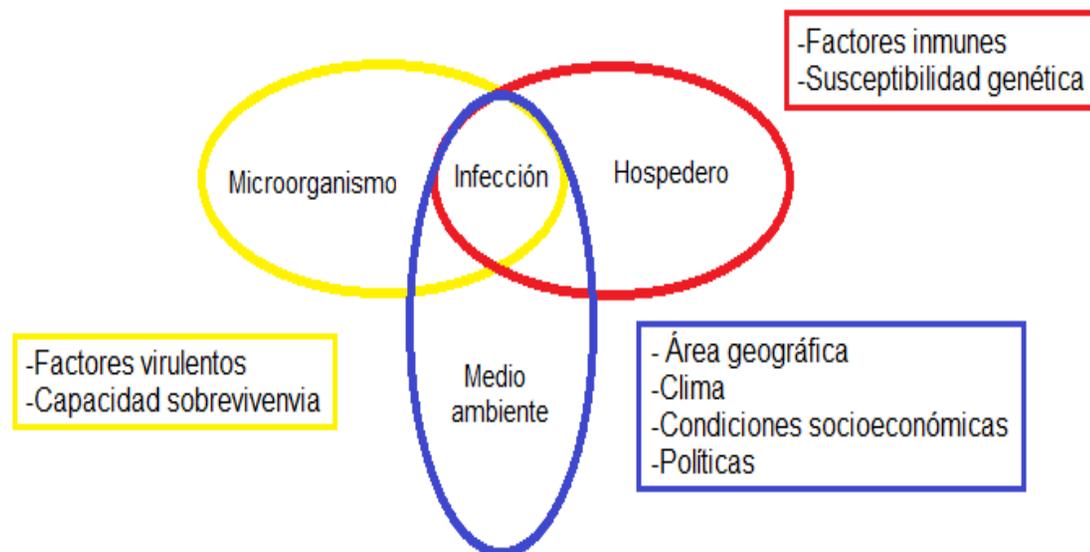


Figura 2: Factores que condicionan las enfermedades infecciosas (Tomado y modificado de Restrepo y col., 2003)

Existen distintas clases de microorganismos patógenos capaces de causar enfermedades infecciosas en el humano, estos pueden clasificarse en: hongos, protozoos, helmintos, virus y bacterias (Pumarola, 2002, en línea).

Una enfermedad infecciosa es cualquier desviación de la salud, por la que parte o la totalidad del hospedero no está equilibrado y es incapaz de realizar sus funciones normales, debido a la presencia del organismo infectante o sus productos. Todo organismo o agente parasitario que produce una enfermedad de este tipo es un patógeno. Su capacidad para producir enfermedad se denomina patogenicidad, y el grado o nivel de expresión de patogenicidad se denomina virulencia (Prescott y col., 1999).

Al inicio del siglo XX, la causa de muerte más frecuente eran las enfermedades infecciosas. En la actualidad estas enfermedades son menos importantes, esto se ha logrado al tener conocimiento de los procesos infecciosos, la mejora de las prácticas sanitarias y el descubrimiento y uso de los agentes antimicrobianos. Sin embargo, aunque vivimos en un mundo donde muchos microorganismos patógenos están controlados, estos pueden ser todavía un riesgo importante para la supervivencia. Por tanto, los microorganismos todavía constituyen serias amenazas para la existencia humana (Madigan y col., 2002).

Entre las bacterias, las clasificadas en la familia *Enterobacteriaceae* son causantes de la mayoría de las infecciones en los tractos gastrointestinal y urinario.

La Infección del tracto urinario (ITU) se define como la presencia de gérmenes en el tracto urinario en ausencia de contaminación externa y puede o no acompañarse de síntomas clínicos tales como necesidad frecuente de orinar, ardor al orinar, micción frecuente y dolores en el vientre bajo (Jiménez, 2003, en línea). Las ITU comprenden una gran variedad de cuadros clínicos, cuyo denominador común es la proliferación de microorganismos (habitualmente bacterias) en el aparato urinario (<http://www.intramed.net/> [Consulta: 18/03/2012]).

La mayor parte de las infecciones de orina se curan sin secuelas, pero este tipo de infecciones pueden conducir al deterioro de la función renal y ser la puerta de entrada de bacteremias, y algunas dan lugar a la formación de cicatrices renales que causan morbilidad aguda y problemas a largo plazo, como insuficiencia renal e hipertensión arterial (Jiménez, 2003, en línea).

Entre los factores que predisponen para contraer una ITU están (<http://www.intramed.net/> [Consulta: 18/03/2012]):

- ♦ Alteraciones anatómicas o funcionales de las vías urinarias: cálculos, válvulas uretrales, tumores, entre otras.
- ♦ Instrumentación del árbol urinario: sondas, catéteres.
- ♦ Embarazo (por compresión mecánica de las vías urinarias debida al útero grávido y a la acción relajante de la progesterona sobre la musculatura lisa de los uréteres).
- ♦ Diabetes, Inmunodepresión, Infecciones simultáneas.
- ♦ Relaciones sexuales.

Los parámetros más importantes para el diagnóstico de una infección se basa en el urocultivo y el análisis de orina (Jiménez, 2003, en línea).

El urocultivo se lleva a cabo con la orina de la primera micción de la mañana o con retención de 3 horas o más, con higiene previa de genitales y desechando la primera parte de la micción, que arrastra los gérmenes de la uretra, recogiendo una muestra del segundo chorro o chorro medio en un recipiente estéril (<http://www.intramed.net/> [Consulta: 18/03/2012]). Se interpreta como significativo el aislamiento de más de 100.000 UFC/mL y como de importancia clínica, según la sintomatología, un número entre 10.000 y 100.000 UFC /mL. En esta interpretación se deben tener en cuenta el tiempo de multiplicación de los microorganismos, considerando algunos géneros y especies individualmente (Pumarola, 2002, en línea).

Para el análisis de orina la muestra se recoge en un recipiente estéril. La mejor muestra es la primera orina matutina. Para la recogida de la muestra es necesario un lavado minucioso previo del perineo, la vulva y el meato uretral, eliminando con agua todos los restos de jabón (este lavado puede realizarse la noche anterior), se debe desechar el chorro inicial y recoger el chorro medio de orina en el recipiente estéril. De los componentes del análisis de orina, los tres más útiles para el diagnóstico de una posible ITU son la esterasa leucocitaria, los nitritos (obtenidos por tira reactiva) y el análisis por microscopía el sedimento (Jiménez, 2003, en línea).

Las bacterias provienen del tracto intestinal en la mayoría de los casos son las causantes de las infecciones en el tracto urinario, por consiguiente los gérmenes más frecuentes son las enterobacterias (<http://www.intramed.net/> [Consulta: 18/03/2012]). Dentro de ellas, *Escherichia coli* es el germen responsable del 80-90% de las ITU que se contraen por primera vez a cualquier edad y sexo, y sobre todo de aquellas no complicadas (Jiménez, 2003, en línea).

1.3 Biocidas

Biocida es un término general para describir una sustancia química, usualmente de amplio espectro, que inactiva los microorganismos. De acuerdo a su especificidad y actividad antimicrobiana ejercen 2 tipos de efectos:

- Microbiostáticos: Impiden el crecimiento de los microorganismos.
- Microbiocidas: destruyen los microorganismos.

Estos términos pueden ser más específicos dependiendo del microorganismo sobre el cual actúe, en caso de impedir el crecimiento pueden ser bacteriostáticos, fungiestáticos y esporostático, y en caso de eliminar al microorganismo serán esporicida, virucida, fungicida y bactericida (Cabrera y col., 2007).

Los biocidas tienen un espectro de actividad más amplio que el de los antibióticos, mientras que los antibióticos suelen tener blancos específicos intracelulares, los biocidas pueden tener múltiples blancos de acción (McDonnell y Russell, 1999).

1.3.1 Clasificación de los biocidas.

Los biocidas se clasifican en:

Esterilizantes: son sustancias involucradas en un proceso físico o químico que destruye completamente o elimina toda la vida microbiana, incluyendo esporas (McDonnell y Russell, 1999).

Preservativos: son sustancias que están involucradas en la prevención de la multiplicación de microorganismos en productos formulados, incluyendo productos farmacéuticos y alimentos (McDonnell y Russell, 1999).

Antisépticos: son sustancias que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos y que son seguros para su aplicación en tejido vivo (Cabrera y col., 2007).

Desinfectantes: son sustancias generalmente químicas que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos, y se usan sobre superficies y objetos inanimados (Cabrera y col., 2007).

Los antisépticos y desinfectantes se utilizan ampliamente en los hospitales y otros centros de salud para una variedad de aplicaciones tópicas y en superficies duras. Además, la creciente preocupación sobre la posibilidad de contaminación microbiana y los riesgos de infección en la industria y el consumo de alimentos, también han dado lugar a un mayor uso de los antisépticos y los desinfectantes por el público en general (McDonnell y Russell, 1999).

1.3.2 Clasificación de los desinfectantes.

Desinfección de alto nivel: Elimina bacterias en forma vegetativa, virus lipofílicos e hidrofílicos, micobacterias, hongos y algunas esporas.

Desinfección de nivel intermedio: Elimina bacterias en forma vegetativa, incluyendo micobacterias, hongos y virus, pero no a las esporas bacterianas.

Desinfección de bajo nivel: Elimina la mayoría de las bacterias, algunos virus lipofílicos y algunos hongos, pero no las micobacterias ni las esporas bacterianas.

El material instrumental clínico se clasifica en: críticos, semicríticos y no críticos, y esto debe considerarse al elegir el desinfectante a usar.

Críticos: requiere total asepsia (esterilizar). Son instrumentos que temporal o definitivamente van a quedar en el interior del organismo. Ejemplo de este tipo de instrumental: prótesis, válvulas, hilos de sutura entre otros.

Semicríticos: deben estar desinfectados, pero no requieren esterilización. Estos objetos entran en contacto con las mucosas o con piel intacta.

No críticos: deben estar rigurosamente limpios. Solo entran en contacto con piel sana, no esta en contacto con ninguna cavidad del individuo (Silva y col., 2006).

1.3.3 Mecanismo de acción de los antisépticos y desinfectantes.

Los estudios sobre el modo de acción de los agentes antimicrobianos sugieren que, a diferencia de los antibióticos para los que la acción es selectiva contra

objetivos específicos de células, los biocidas pueden actuar en uno o varios sitios, dentro de la pared celular, membrana o citoplasma (Gilbert y McBain, 2003). En la actualidad se tiene más información sobre los mecanismos de la acción antibacteriana de los antisépticos y desinfectantes. Cualquiera que sea el tipo de célula microbiana, es probable que haya una secuencia común de eventos que suceden al poner en contacto la célula con el antimicrobiano, estos son:

- 1-. Interacción del antiséptico o desinfectante con la superficie celular.
- 2-. Penetración en la célula.
- 3-. Acción en el sitio blanco.

La naturaleza y composición de la superficie celular puede variar de un tipo de célula a otro, pero también puede ser alterada como resultado de cambios en el ambiente. La interacción en la superficie celular puede producir un efecto significativo sobre la viabilidad bacteriana. Las cubiertas más externas de las células microbianas por lo tanto, pueden tener un efecto significativo en la sensibilidad (o insensibilidad) a los antisépticos y desinfectantes de las células bacterianas (McDonell y Russell, 1999).

- **Acción en la pared celular**

Algunos biocidas afectan a la pared celular de bacterias Gram negativas mediante la unión no covalente a los componentes lipídicos. Las consecuencias de esta interacción física pueden ser cambio en el aspecto visible al microscopio electrónico, especialmente la formación de ampollas y protuberancias superficiales. Algunos biocidas se unen covalentemente a los componentes de la

pared celular, incluyendo el peptidoglicano. En algunos casos no se afecta la apariencia de la pared, pero la función si se ve afectada provocando cambios en las propiedades de barrera de la envoltura celular incluyendo el aumento de la permeabilidad (Russell y col., 2004).

- **Acción sobre la membrana celular**

a- Fuga de los componentes celulares: pueden ocurrir fugas de los constituyentes de bajo peso molecular a partir de células enteras tratadas con un biocida, entre estos: nucleósidos, nucleótidos y aminoácidos. La fuga es generalmente rápida, y el aumento de la concentración de biocida provoca fugas más rápidas y extensas de los componentes celulares, provocando daño a la célula bacteriana (Russell y col., 2004).

b- Inhibición de los procesos de energía: El estado de energía de las membranas bacterianas se expresa como la fuerza protón motriz (PMF, por sus siglas en ingles), compuesto de un potencial eléctrico y un gradiente de protones que se mantiene en las bacterias a través de su membrana citoplasmática para conducir los procesos vitales, incluyendo el transporte activo de solutos, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP. La PMF es generado por las reacciones de oxidación-reducción que ocurren durante el transporte de electrones. Diferentes tipos de biocidas ejercen efectos sobre la PMF a través de la membrana citoplasmática, desacoplando así la síntesis de ATP a partir del transporte de electrones (Russell y col., 2004).

La interacción con el citoplasma

a-. Desnaturalización y coagulación de proteína: algunos compuestos biocidas son agentes alquilantes que reaccionan fácilmente con los grupos amino, carboxilo e hidroxilo en las proteínas, y causan la modificación irreversible de la estructura de estas proteínas. Otros agentes químicos desnaturalizan las proteínas por alteración de las interacciones (puentes de disulfuro, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, hidrofílicas e hidrófobas) que mantienen la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. Los agentes que interfieren con estas interacciones pueden causar la coagulación irreversible de la proteína (Russell y col., 2004).

b-. Efectos sobre los ácidos nucleicos: algunos de los antimicrobianos empleados tiene la capacidad de interactuar con el ADN de las bacterias, causando daños en el mismo (Russell y col., 2004).

En algunos agentes, tales como las biguanidas poliméricas, la alteración de la pared celular es una parte integral de su acción; por desestabilizar los cationes asociados con la envoltura celular, causando con ello la reorganización del lipopolisacárido (LPS). Estos agentes auto-promueven su entrada a la célula, donde ejercen su acción letal; otros exhiben propiedades de superficie activa (tensoactivos), como los compuestos de amonio cuaternario, fenoles y fenoles sustituidos, los cuales actúan causando daño en la membrana celular. Para los biocidas químicamente reactivos, tales como el cloro y los agentes liberadores de oxígeno, la acción bactericida más probable es el resultado de la oxidación de los

grupos tiol en toda una gama de enzimas unidas a la membrana e intracelulares, mientras que los agentes tales como el alcohol y la clorhexidina en concentraciones bactericidas, producen la desnaturalización de las proteínas citoplasmáticas y la coagulación del contenido de la célula. Cabe destacar que incluso para los biocidas que afectan a varios objetivos y tienen distintos mecanismos (tabla II), la susceptibilidad de cada destino es variable y depende de la concentración del biocida (Gilbert y McBain, 2003).

Tabla II: Resumen de los mecanismos de acción antibacteriana de los antisépticos y desinfectantes.

Sitio blanco	Antiséptico o desinfectante	Mecanismo de acción
Envoltura celular (pared celular, membrana externa)	Glutaraldehído EDTA, otros permeabilizantes	Unión cruzada a proteínas Bacteria gramnegativa: remoción de Mg ⁺⁺ , liberación de algunos LPS
Membrana interna citoplasmática	CAC Clorhexidina Diaminas PHMB (mezcla heterodispersa de bioguanidas de polihexametileno), alexidina Fenoles	Daño generalizado de la membrana que comprometen fosfolípidos de las dos membranas. Las bajas concentraciones afectan la integridad de la membrana, las altas concentraciones causan congelamiento del citoplasma. Inducción a la pérdida de aminoácidos. Fase de separación y formación de dominios de lípidos de membrana. Pérdida, desacople.
Unión cruzada a macromoléculas	Formaldehído Glutaraldehído	Unión cruzada de proteínas, ARN y ADN. Unión cruzada de proteínas de la envoltura celular y en otros sitios celulares.
Intercalación con el ADN	Acridinas	Intercalación de una molécula de acridina entre dos capas de pares de bases en el ADN.
Interacción con grupos tiol	Compuestos con plata	Enzimas que se unen a membrana interacción con grupos tiol
Efectos en el ADN	Halógenos Peróxido de hidrógeno, iones de plata	Inhibición de la síntesis del ADN Ruptura de la hebra de ADN
Agentes oxidantes	Halógenos Peroxígenos	Oxidación de los grupos tioles a disulfitos, sulfóxidos o disulfóxidos. Peróxido de hidrógeno: Actividad debida a la formación de radicales libres OH ⁻ , que oxida a los grupos tioles en enzimas y proteínas; ácido paracético: Inhibición de los grupos tioles en proteínas y enzimas.

Tomado y modificado de Cabrera y col., 2007

1.3.4 Factores que afectan la actividad de los desinfectantes.

La actividad biocida se ve afectada por varios factores, en particular, la concentración, el tiempo de contacto, el pH, la temperatura, la presencia de material de interferencia, y la naturaleza, el número, la ubicación y la condición del microorganismo (bacterias, esporas, levaduras y hongos, protozoos) o entidades (priones, virus) (Russell, 2003).

Concentración del desinfectante y tiempo de contacto: Estas variables están muy relacionadas entre sí, ya que al modificar la concentración provoca cambios en el tiempo de contacto para lograr el mismo efecto antimicrobiano. Además, no todas las bacterias mueren simultáneamente, ni cuando se aplica un exceso del agente (Gilbert y McBain, 2003).

Temperatura: La actividad de un desinfectante suele aumentar cuando la temperatura a la que actúa se incrementa, pero en algunos casos a temperaturas muy elevadas algunos agentes puede inactivarse (Russell y col., 2004).

pH: El pH del medio ambiente puede influir en la actividad de los biocidas produciendo cambios tanto en la molécula antimicrobiana como en la superficie celular. En el primer caso, el pH afecta la ionización de la molécula y esto afecta la actividad del producto, algunos biocidas son más eficaces a pH ácidos, y otros son mejores a pH básicos. En el segundo caso, a medida que aumenta el pH, el número de grupos cargados negativamente sobre la superficie de las células bacterianas aumenta. Así, las moléculas cargadas positivamente tienen un mayor

grado de unión, por ejemplo, los compuestos de amonio cuaternario y los colorantes, como el cristal violeta y violeta de etilo (Russell y col., 2004).

Presencia de material de interferencia: Entre las sustancias que mayoritariamente interfieren con la acción de los desinfectantes se encuentra la materia orgánica. La materia orgánica se produce en varias formas: suero, sangre, pus, tierra, residuos de alimentos, materia fecal, entre otros. Esta puede interferir con la actividad microbida de los desinfectantes y otros compuestos antimicrobianos, esto debido a que se produce una interacción entre el biocida y la materia orgánica, dejando así una concentración reducida de agente antimicrobiano para atacar los microorganismos, también es probable que la materia orgánica proteja a los microorganismos de los ataques (Russell y col., 2004).

El número y la ubicación de los microorganismos: La concentración de los microorganismos afecta la actividad del desinfectante empleado, ya que es más fácil para un agente antimicrobiano ser eficaz cuando hay pocos microorganismos contra los que tiene que actuar. Del mismo modo, la ubicación de los microorganismos debe ser considerada en la evaluación de la actividad antimicrobiana (Russell y col., 2004).

1.3.5 Compuestos de amonio cuaternario.

Los agentes tensoactivos son agentes de superficie activa (surfactantes) que tienen dos regiones en su estructura molecular: un grupo hidrocarburo repelente al agua (hidrofóbico), y un grupo con afinidad por el agua (hidrófilico o polar).

Dependiendo de la carga o la ausencia de la ionización del grupo hidrófilo, los agentes tensoactivos se clasifican en:

- Compuestos aniónicos: cuando la carga que posee es negativa.
- Compuestos catiónicos: cuando la carga que posee es positiva.
- Compuestos no iónicos: la parte hidrofóbica de la molécula no es un ion.
- Compuestos anfóteros (anfótero): tienen carácter de mezcla aniónica-catiónica. Estos compuestos combinan la propiedad detergente de los compuestos aniónicos con las propiedades bactericidas de los compuestos catiónicos (Russell, 2004)

Cabe destacar que de estos compuestos, los catiónicos han sido utilizados ampliamente en la antisepsia por más de medio siglo, sin una aparente reducción de su eficacia, y continúan siendo el pilar de la antisepsia y la desinfección química de rutina (Gilbert y Moore, 2005).

Los compuestos de amonio cuaternario presentan una estructura general $NR_1R_2R_3R_4^+ X^-$ (figura 3) (Hegstad y col., 2010).

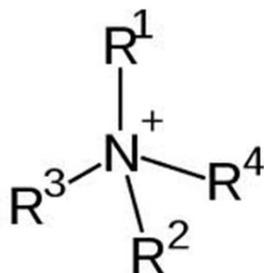


Figura 3: Estructura de los compuestos de amonio cuaternario (tomado de <http://laenciclopediagalactica.info/2011/12/compuestos-cuaternarios-de-amonio-qacs/> consultado 01/02/12)

Entre los antimicrobianos catiónicos comúnmente usados están: los compuestos de amonio cuaternario QAC (cetrimida, cloruro de benzalconio), bisbiguanidas (clorhexidina, hibitane) y biguanidas poliméricas (Vantocil). Todas estas moléculas, cargadas positivamente, se adhieren firmemente a las paredes celulares y las membranas de las bacterias debido a que están cargadas negativamente, siendo estos los sitios blancos de este tipo de agentes (Gilbert y Moore, 2005).

La superficie más externa de las células bacterianas posee una carga neta negativa, a menudo estabilizada por la presencia de cationes divalentes, por lo tanto los agentes antimicrobianos catiónicos tienen una alta afinidad de unión a las células bacterianas. A menudo, estos agentes sólo requieren una fuerte carga positiva junto con una región hidrófoba, con el fin de interactuar con la superficie de la célula e integrarse en la membrana citoplasmática (Gilbert y Moore, 2005).

Entre los antisépticos y desinfectantes más útiles, están los QACs, que se han utilizado para una variedad de propósitos clínicos. Además de tener propiedades antimicrobianas, los QACs son también excelentes agentes para la limpieza de superficies duras y desodorización (McDonnell y Russell, 1999).

Los QAC son compuestos tensioactivos, anfóteros, que contienen generalmente un nitrógeno cuaternario asociado con, al menos, un sustituyente hidrofóbico. La longitud de la cadena hidrófoba afecta la efectividad del antimicrobiano. Para bacterias Gram positivas y levaduras, la actividad se maximiza con longitudes de cadena de $n = 12-14$, mientras que para bacterias

Gram negativas, la actividad óptima se consigue para los compuestos con una longitud de cadena de $n = 14-16$. La actividad antimicrobiana de los QAC hacia las diferentes especies de bacterias depende de la hidrofobicidad de esta cadena. Los QAC son incompatibles con una amplia gama de agentes químicos, incluyendo los tensioactivos aniónicos, surfactantes no iónicos como tween, lecitina y otras sustancias que contengan grasas (Russell, 2004).

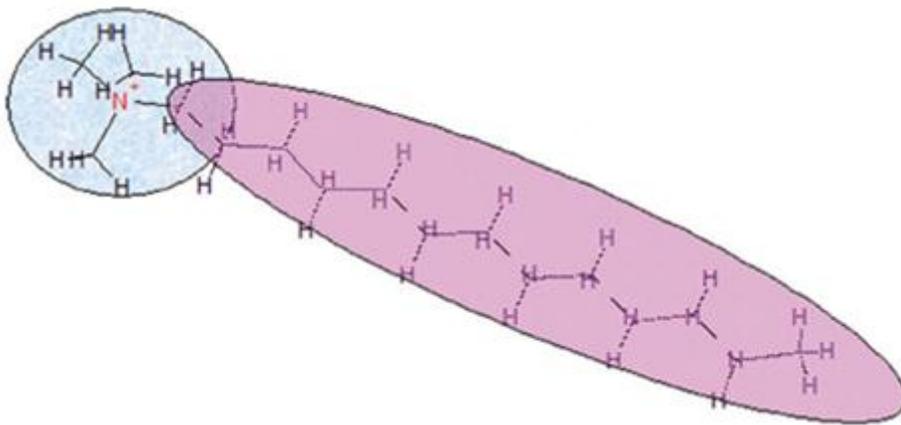


Figura 4: Representación de la cadena larga hidrófoba (morado) en la molécula de amonio cuaternario (tomado y modificado de Gilbert y Moore, 2005).

El modo de acción de los QAC contra las células bacterianas implica una perturbación general de las membranas celulares. Tal acción conduce a una fuga generalizada y progresiva de materiales citoplasmáticos al medio ambiente. La actividad antimicrobiana de los QACs se relaciona principalmente con la propiedad de surfactante catiónico (Hegstad y col., 2010). La secuencia de eventos que se producen en los microorganismos expuestos a los agentes catiónicos son: (i) la adsorción y la penetración del agente en la pared celular, (ii) la reacción con la membrana citoplasmática (lípidos o proteínas), seguido por la desorganización de la membrana, (iii) la fuga de material intracelular de bajo peso molecular, (iv) la

degradación de proteínas y ácidos nucleicos, y (v) la lisis de la pared causada por las enzimas autolíticas, ocurriendo una pérdida de la estructura, la organización y la integridad de la membrana citoplasmática en las bacterias, junto con otros efectos perjudiciales para la célula bacteriana (figura 5) (McDonnell y Russell, 1999).

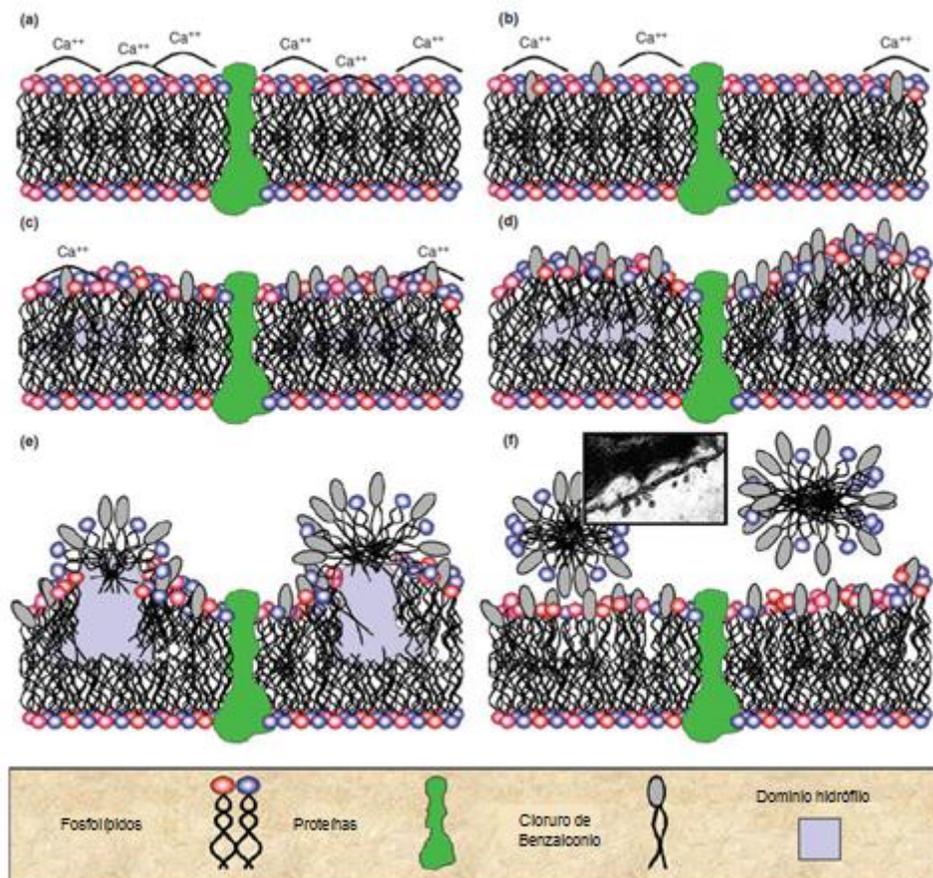


Figura 5: Mecanismo de acción de los biocidas de amonio cuaternario. Los segmentos (a-f) muestran la acción progresiva de la unión de las cabezas de los QACs con la cabeza polar de los fosfolípidos dentro de la membrana. Esto conduce a la disminución de la fluidez de las bicapas y crea poros hidrófilos en la membrana. La función de las proteínas es perturbada con la lisis de la célula, y la solubilización de los fosfolípidos (Gilbert y Moore, 2005).

La actividad antimicrobiana de los QAC depende de la concentración del agente. A bajas concentraciones el agente se une firmemente a los sitios

aniónicos que se encuentran en la superficie de la membrana, haciendo que las células pierdan la capacidad de osmorregulación; los niveles intermedios perturban algunos procesos que ocurren en la membrana, tales como la respiración, el transporte de solutos, y la biosíntesis de la pared celular. Las altas concentraciones eliminan las células por solubilización de las membranas y por liberación todo el contenido celular (Gilbert y Moore, 2005).

A nivel molecular la acción de los QAC implica una asociación del nitrógeno cargado positivamente con los fosfolípidos de la membrana. La cola hidrófoba entonces penetra la membrana hidrofóbica. Así, a baja concentración, tal interacción aumenta la presión superficial, disminuyendo la fluidez de membrana y perdiendo funciones osmoregulatorias y fisiológicas. A concentraciones mayores se forman agregados micelares mezclados, que solubilizan los componentes hidrofóbicos de la membrana lipídica (Gilbert y Moore, 2005).

El Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio, es uno de los compuestos de amonio cuaternario de mayor uso, además es agente activo de los antisépticos de acción polivalente (Guariglia y col., 2008). La estructura química de este compuesto se muestra en la figura 6.

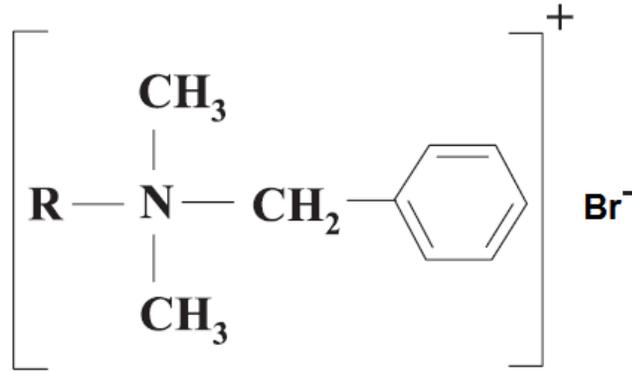


Figura 6: Estructura química del Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio (tomado y modificado de Ioannou y col., 2007)

1.3.2 Hipoclorito de sodio.

Un gran número de compuestos provenientes del cloro están disponibles comercialmente. Entre estos se puede mencionar el cloro líquido, el dióxido de cloro, los hipocloritos de sodio y calcio. El cloro elemental, es un gas, puede ser suministrado como un líquido por compresión y enfriamiento del gas, pero cuando se libera bajo presión atmosférica, se convierte inmediatamente en forma gaseosa. Debido a los peligros del gas de cloro, rara vez se utiliza como desinfectante. El dióxido de cloro es un compuesto muy reactivo y por consiguiente tampoco puede ser usado como desinfectante. Los hipocloritos son sales de los iones hipoclorito (OCl_2). La sal de sodio produce una solución acuosa, mientras que la sal de calcio es un sólido. La especie activa es el ácido hipocloroso (HOCl) no disociado, no el cloro (Rutala y Weber, 1997).

El hipoclorito de sodio (NaOCl), es un compuesto oxidante, de acción rápida (figura 7), utilizado a gran escala para la desinfección de superficies, la desinfección de ropa hospitalaria y desechos, para descontaminar salpicaduras de

sangre, desinfección de equipos y mesas de trabajo resistentes a la oxidación, eliminación de olores y desinfección del agua. Es el compuesto más usado para la desinfección y limpieza en el área doméstica (Rutala y Weber, 1997).

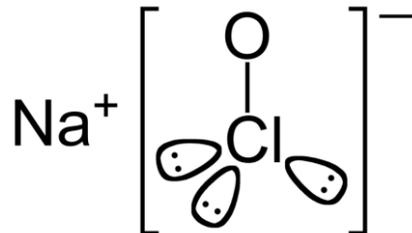


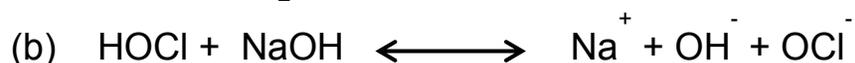
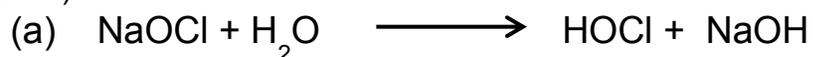
Figura 7: Estructura del hipoclorito de sodio (tomado de <http://www.indiamart.com/arbudachemical/> consultado 01/02/12).

El hipoclorito ha mantenido una posición predominante como desinfectante eficiente, ya que tiene muchas de las propiedades del desinfectante ideal, que incluyen: un amplio espectro antimicrobiano, un bactericida de acción rápida, la solubilidad en agua, una estabilidad relativa tanto en su forma concentrada como cuando se encuentra diluido; no tóxico para humanos a las concentraciones de uso, tiene acción desodorante, no inflamable y es de bajo costo. Las desventajas de los hipocloritos como desinfectante incluyen: la irritación a las membranas mucosas, el potencial para interactuar con algunos productos químicos, lo que resulta en la formación de gas de cloro tóxico, el olor cuando se utiliza en formas concentradas, y la disminución de la eficacia en presencia de materia orgánica (Rutala y Weber, 1997).

El hipoclorito de sodio es comercializado como una solución clara, de ligero color verde-amarillento y olor característico (<http://www.lenntech.es> 05/02/2012).

Las soluciones de hipoclorito de sodio de uso doméstico contienen de 4 a 6% de hipoclorito (Rutala y Weber, 1997).

El hipoclorito de sodio tiene una actividad antimicrobiana amplia, en general, los virus y las bacterias vegetativas son más susceptibles a los hipocloritos de lo que lo son las esporas bacterianas y micobacterias (Russell, 2004). El mecanismo que se ha postulado, por el cual el cloro actúa como un desinfectante es la inhibición de las principales reacciones enzimáticas dentro de la célula y la desnaturalización de las proteínas, mediante el poder de oxidación de los átomos de oxígeno libre y las reacciones de sustitución del cloro. Cuando el hipoclorito de sodio se disuelve en agua, se generan dos sustancias, estas son el ácido hipocloroso (HOCl) y el ion hipoclorito (OCl⁻), el cual es menos activo. La especie activa es el ácido hipocloroso (HOCl). La disociación del ácido hipocloroso a la forma menos microbicida (ion hipoclorito) es dependiente del pH. A medida que el pH aumenta, se ve favorecida la formación del ion hipoclorito y disminuye la actividad microbicida (Rutala y Weber, 1997). Dos factores que pueden afectar notablemente la acción antimicrobiana del hipoclorito de sodio por la materia orgánica, ya que el cloro es un químico altamente reactivo, y el pH, que como ya se mencionó los hipocloritos son más activos a pH ácido que a pH alcalino (Russell, 2004)



Esquema: (a) Hipoclorito de sodio al disolverse en agua. (b) La disociación del ácido hipocloroso (tomado y modificado de <http://www.lenntech.es> 05/02/2012).

La pared celular de los microorganismos patógenos está cargada negativamente, de esta manera puede ser penetrada por el ácido hipocloroso neutro.

Muchos factores afectan la estabilidad del cloro y la eficacia de su actividad antimicrobiana. Entre estos se puede mencionar: la concentración de cloro, la presencia y concentración de iones de metales pesados, el pH de la solución, la temperatura de la solución, la presencia de una biopelícula, la presencia de material orgánico, y la radiación ultravioleta. En general, las soluciones de cloro más estables tienen las siguientes características: bajas concentraciones de cloro, ausencia de cobre, níquel, cobalto u otros catalizadores de descomposición, la temperatura baja, ausencia de material orgánico, y de almacenamiento en la oscuridad y en contenedores cerrados (es decir, protegida de la luz UV). Por ende, el uso a temperatura ambiente, en forma diluida, en un rango de pH adecuado, en ausencia de catalizadores y al almacenamiento en recipientes opacos son las condiciones que favorecen su estabilidad al usarlo tanto en hospitales, y otros centros de salud y como en el área doméstica (Rutala y Weber, 1997).

1.4 Resistencia bacteriana a los biocidas.

Para sobrevivir en el medio ambiente, las bacterias necesitan responder a situaciones estresantes, tales como baja concentraciones de nutrientes y crecimiento en condiciones no ideales. Además, pueden ser expuestas a un amplio rango de biocidas que pueden actuar como una presión selectiva para la selección y aislamiento de cultivos resistentes (Russell, 2003).

Un cultivo se considera resistente a un biocida cuando no se inactiva ante la concentración recomendada del antimicrobiano, o a una concentración del biocida que inactiva otras cepas de ese organismo (Russell, 2003).

Las bacterias tienen distintos mecanismos de resistencia a los agentes biocidas: la resistencia intrínseca y la resistencia adquirida.

1.4.1 Resistencia intrínseca.

La resistencia intrínseca es una propiedad natural, cromosómicamente codificada, de una célula bacteriana que le permite eludir la acción de un antiséptico o desinfectante. Las bacterias Gram negativas tienden a ser más resistentes que los organismos Gram positivos (McDonnell y Russell, 1999). Esta resistencia es usualmente mostrada como una reducción en la entrada del biocida y ocurre como un resultado de la eficiencia de las barreras de impermeabilidad o de las bombas de exclusión (Russell, 2003).

La resistencia puede estar mediada por la impermeabilidad, el flujo de salida y la adaptación fenotípica (biopelículas):

Impermeabilidad.

Las estructuras que confieren impermeabilidad bacteriana incluyen las paredes celulares y las esporas de los microorganismos. Entre las bacterias vegetativas, la susceptibilidad a un biocida es una función de la permeabilidad del biocida a través de la pared celular; las bacterias Gram positivas son más permeables y susceptibles a los biocidas, mientras que las micobacterias y las bacterias Gram negativas, que tienen una pared celular más compleja, son menos permeables y susceptibles. La pared celular en las bacterias Gram negativas se compone de

una membrana interna y proteínas asociadas al eflujo, peptidoglicano, y una envoltura externa compuesta de dos capas de una membrana externa y componentes de lipopolisacáridos. La membrana externa contiene canales hidrófilos, las porinas, que regulan el paso de solutos. Los cambios en la membrana externa que afectan el tamaño de porinas o alteran la expresión de las porinas para prevenir la penetración, resultan en una susceptibilidad reducida a los biocidas (Sheldon, 2005).

Eflujo de salida.

Las bombas de eflujo son proteínas transportadoras de membrana, involucradas en la expulsión de sustancias tóxicas desde el interior de las células al exterior. Estas bombas se agrupan en distintas familias capaces de expulsar una gran variedad de compuestos (Pidcock, 2006).

Adaptación fenotípica (biopelículas).

Una biopelícula es una comunidad de microorganismos sésiles, que están irreversiblemente unidos a una superficie, embebidos en una matriz extracelular polimérica, y exhiben una tasa de crecimiento alterada (Sheldon, 2005).

Las biopelículas se caracterizan por:

- ♦ Adherencia
- ♦ Heterogeneidad
- ♦ Diferentes microambientes (pH, tensión O₂, concentración de iones, carbono, nitrógeno)
- ♦ Resistente a las defensas del hospedero, agentes antimicrobianos y detergentes

- ♦ Quorum sensing (Bjorland y col., 2005)

La resistencia a los biocidas en las biopelículas se le atribuye a la unión del biocida a la biopelícula, la neutralización, inactivación o la degradación del biocida (Sheldon, 2005).

1.4.2 Resistencia adquirida.

La resistencia adquirida puede surgir por mutación o adaptación del microorganismo, o por la adquisición de elementos tales como plásmidos, transposones u otro elemento genético (Russell, 2003).

Mecanismos de resistencia adquirida a los biocidas.

La resistencia a los biocidas se produce a través de uno de los 3 mecanismos generales, que incluyen la restricción de la entrada del biocida a las células, la salida activa de los biocidas y, por último, la inactivación de los biocidas (Russell, 2004).

Restricción de la entrada del biocida a las células.

Dado los múltiples objetivos que tienen la mayoría de los biocidas en las células bacterianas, es razonable que los cambios celulares tienen un impacto sobre la acumulación de biocida (Russell, 2004). Los cambios de permeabilidad son responsables de la resistencia adquirida a los biocidas en bacterias Gram negativas, sugiriendo la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de membrana externa (Poole, 2002).

Flujo de salida

Las proteínas de eflujo proporcionan a los microorganismos resistencia a los biocidas. Éstas muestran una amplia especificidad de sustrato, con capacidad para una variedad de agentes estructuralmente no relacionados, que también puede incluir los antibióticos.

Los genes de resistencia pueden estar codificados en plásmidos (tabla III). La adquisición de bombas de eflujo codificadas por plásmidos es especialmente importante para los mecanismos de resistencia a los QAC. Los genes que codifican las bombas de eflujo son usualmente transmitidos en plásmidos, confiriendo una menor susceptibilidad a los agentes antisépticos. Entre estos genes podemos mencionar: *qacA*, *qacB*, estos son comunes en las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. El gen *qacEΔ1* es el derivado semifuncional de *qacE*. Este determinante confiere resistencia a niveles bajos de exportación de los QAC. El gen *qacA* confiere resistencia a una variedad de cationes orgánicos, incluidos los cationes monovalentes y divalentes. Se encuentra en una variedad de plásmidos y en el cromosoma. El gen *qacB* proporciona resistencia a cationes orgánicos monovalentes y en niveles bajos para algunos compuestos divalentes y se encuentra en varios plásmidos. Estos genes (*qacA* y *qacB*) están estrechamente relacionados, se ha demostrado que sólo hay uno o dos cambios en la secuencia, que resultan en un solo cambio del aminoácido en el residuo 323 Asp para *qacA*, y Ala en *qacB* (Mayer y col., 2001).

Inactivación

Otro mecanismo de resistencia consiste en inactivar al biocida, para que no ejerza su acción antimicrobiana. Ejemplo de este mecanismo es la formaldehído deshidrogenasa, codificada por plásmidos, que proporciona resistencia al formaldehído en *E. coli* (Russell, 2004).

Tabla III: Posibles mecanismos de resistencia a desinfectantes codificados en plásmidos.

Agente Químico	Ejemplos	Mecanismo de resistencia
Antisépticos o desinfectantes	Sales de clorhexidina	♦ Inactivación del agente, bombas de eflujo y disminución de la entrada del agente.
	QACs	
	Compuestos de plata	♦ Bombas de eflujo y disminución de la entrada del agente.
	Formaldehido	
	Acridinas	♦ Disminución de la entrada del agente.
	Diamidinas	♦ Alteraciones en la superficie celular.
Otros Biocidas	Cristal violeta	♦ Bombas de eflujo <i>S. aureus</i> .
		♦ Bombas de eflujo <i>S. aureus</i> .
	Organomercuriales	♦ Bombas de eflujo <i>S. aureus</i> .
	Bromuro de etidio	♦ Inactivación. ♦ Bombas de eflujo.

Tomado y modificado de McDonnell y Russell, 1999.

1.4.3 Factores contribuyen a la resistencia bacteriana a los biocidas.

El uso indiscriminado de los biocidas ha seleccionado a las bacterias dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos, moleculares y celulares) (tabla IV), que desarrollen estrategias inherentes y adquiridas, que les permiten evadir con efectividad la acción de estos compuestos (Cabrera y col., 2007). Otros factores que contribuyen al desarrollo de la resistencia son:

- La presencia en el medio ambiente de los residuos de biocidas.
- El uso incorrecto de los biocidas.
- El uso de un biocida que es ineficaz contra el microorganismo contaminante

(Russell, 2003).

- El uso de elementos para limpieza casera, ya que las sustancias antibacterianas añadidas a estos elementos pueden apresurar la selección de cepas resistentes (Cabrera y col, 2007).

La creciente preocupación por la posibilidad de contaminación microbiana y los riesgos de infección en el mercado de los alimentos, también han llevado a un aumento en el uso de los antisépticos y los desinfectantes por el público en general (McDonnell y Russell, 1999).

Tabla IV: Mecanismos de resistencia bacteriana a los biocidas

Mecanismos de resistencia
<i>Intrínsecos</i>
Impermeabilidad.
Bombas de eflujo.
Biopelículas.
<i>Adquiridos</i>
Inactivación/modificación
Restricción de la entrada del biocida a las células
Disminución en acumulación (mediado por eflujo)
Tomado y modificado Cabrera y col., 2007

La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos representa un problema de salud pública a nivel mundial. Este fenómeno adquiere mayores dimensiones en el ambiente hospitalario, debido a la presión selectiva ejercida por el uso de los antimicrobianos, promoviendo la selección y acumulación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas residentes en el recinto (Redondo y col., 2008). Pero también es necesario estudiar la presencia de estos genes en bacterias que no hayan sido aisladas de ambientes hospitalarios, que no están expuestas a esta presión selectiva constante, pero que si presentan resistencia a los antibióticos (Cabrera y col., 2007).

Cabe destacar que la presencia de enterobacterias resistentes a una amplia variedad de antimicrobianos es cada vez mayor e incrementa la necesidad de detectar estas resistencias precozmente en el laboratorio (Famiglietti y col., 2005). Las especies bacterianas que habitan en el tracto intestinal de los animales superiores tienen que ser capaces de sobrevivir a la variedad de productos químicos nocivos producidos en ese entorno. Los organismos entéricos Gram negativos pueden sobrevivir y crecer en concentraciones de agentes tales como sales biliares y ácidos grasos, que son inhibidores de bacterias Gram positivas. Una variedad de organismos patógenos pueden desarrollar resistencia a los agentes biocidas a través de la adquisición de genes de resistencia, a menudo en los plásmidos y otros elementos genéticos o a través de mutaciones. Además, mediante adaptación (es decir, en ausencia de mutación) pueden cambiar en respuesta a la exposición de biocidas o cambios en la fisiología celular (Russell y col., 2004)

1.5 Bombas de eflujo.

A través de la evolución de los microorganismos, se han ido seleccionando mecanismos de defensa frente a los efectos tóxicos de los antimicrobianos y otros fármacos. Uno de estos mecanismos es la excreción activa del antimicrobiano acumulado en la célula a través de las proteínas que conforman sistemas de eflujo (Marchetti y col., 2011).

El eflujo es el bombeo de un soluto fuera de una célula (Pidcock, 2006). Las bombas de eflujo son transportadoras de membrana, involucradas generalmente en la extrusión de sustancias tóxicas desde el interior de las células al medio

externo. Estas proteínas se encuentran presentes en microorganismos Gram positivos, Gram negativos y eucariotas. Las bombas de flujo pueden ser específicas para un sustrato o puede transportar una serie de compuestos estructuralmente diferentes, y a la vez pueden discriminar entre sustratos y componentes celulares proporcionando resistencia a múltiples drogas (Multiple Drug Resistance MDR) (Marchetti y col., 2011). El aumento de eflujo disminuye la concentración intracelular del antimicrobiano, el organismo se hace menos susceptible a dicho agente, permitiendo así la supervivencia bacteriana para un lapso mayor de tiempo. Es importante destacar que los genes que codifican las bombas de flujo pueden encontrarse en el cromosoma o en elementos transmisibles, tales como plásmidos (Piddock, 2006).

Todos los genomas bacterianos estudiados contienen diversidad de genes para bombas de eflujo. Se ha estimado que entre el 5- 10% de todos los genes de un microorganismo están involucrados en el transporte y una gran proporción de los mismos codifican para bombas de eflujo (Marchetti y col., 2011).

Los sistemas de multirresistencia a fármacos (MDR) son capaces de expulsar, de forma relativamente inespecífica, un amplio número de sustratos no relacionados entre sí estructuralmente. Los primeros sistemas MDR descritos en bacterias fueron los QacA en *Staphylococcus aureus* y EmrB en *Escherichia coli* (Sánchez, 2003). Estos sistemas de eflujo de múltiples fármacos representan una amenaza clínica preocupante, ya que la adquisición de un sistema único por una célula puede disminuir su susceptibilidad a un amplio espectro de fármacos quimioterapéuticos (Paulsen y col., 1993).

El hecho que estas bombas reconozcan gran variedad de sustratos estructuralmente distintos, es debido a que la identificación del sustrato está basada en las propiedades físico-químicas (hidrofobicidad, aromaticidad, capacidad de unir hidrogeno y carácter ionizable) y no en las propiedades químicas definidas, como ocurre en el paso de enzima-sustrato o ligando-receptor (Marchetti y col., 2011).

Los residuos de aminoácidos presentes en la proteína transportadora afectan la función del transportador, un ejemplo de esto es la presencia de residuos ácidos (ácido aspártico o glutámico), que son esenciales para el transporte de moléculas cargadas positivamente (Sánchez, 2003).

Se han identificado en el cromosoma de una misma bacteria numerosos genes que codifican diferentes transportadores, esto indica que la expulsión de fármacos debe ser un efecto colateral de la función principal para la cual han sido seleccionados, estando estos implicados en mecanismos generales de detoxificación (Sánchez, 2003).

1.5.1 Familias de bombas de eflujo.

Los sistemas de eflujos se encuentran agrupados en familias, basadas en la similitud de las secuencias de aminoácidos, las similitudes de tamaño y las estructuras secundarias. Filogenéticamente, las bombas de eflujo pertenecen a familias denominadas:

- 1-. Familia de casete de unión al ATP (ATP binding cassette ABC).
- 2-. Superfamilia del facilitador principal (major facilitator superfamily MFS).

3-. Familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (multidrug and toxic-compound extrusion MATE).

4-. Familia de resistencia a multifármacos pequeños (small multidrug resistance SMR).

5-. Familia de resistencia a división por nodulación (resistance nodulation division RND).

La familia ABC esta conformada por transportadores activos primarios cuya actividad depende de la captación e hidrólisis de ATP, mientras que las familias SMR, MATE, MFS, RND son transportadores secundarios, ya que su actividad se lleva a cabo por gradiente de protones. Un mínimo de 12 segmentos transmembrana son requeridos en su estructura para poder llevar a cabo el transporte del sustrato. Dos de estas superfamilias: la familia de casete de unión al ATP (ABC) y la superfamilia del facilitador principal (MFS), se encuentran distribuidas entre organismos procariotas y eucariotas. RND, SMR y MATE están descritas únicamente en procariotas (Marchetti y col., 2011).

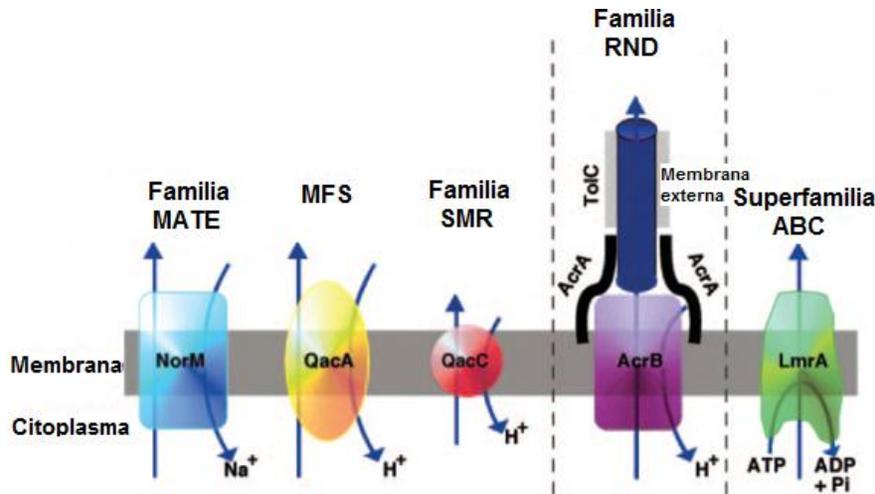


Figura 8: Diagrama de comparación de las 5 familias de bombas de eflujo ABC: familia de casete de unión al ATP. MFS: superfamilia del facilitador principal. MATE: familia de extrusión de multifármacos y tóxicos. SMR: familia de resistencia a multifármacos pequeños. RND: familia de resistencia a división por nodulación (Tomado de Piddock, 2006).

Familia de casete de unión al ATP (ATP binding cassette ABC): son transportadores primarios presentes en las células eucariotas, eubacterias y archaeobacterias. Estas bombas utilizan como fuente de energía la hidrólisis de moléculas de ATP. Esta superfamilia comprende dos clases de proteínas diferentes, las denominadas tipo-procariota (PK-type) y las de tipo-eucariota (EK-type). Las proteínas PK-type presentan tres componentes: (1) dos proteínas integrales con seis segmentos transmembrana, (2) dos proteínas periféricas que capturan e hidrolizan ATP, y (3) una proteína periplásmica donde se une el sustrato. En las bacterias, los transportadores tipo ABC poseen alta especificidad por los sustratos, que incluyen azúcares, aminoácidos, cationes metálicos, complejos orgánicos de hierro, vitaminas y antimicrobianos (Marchetti y col., 2011).

Superfamilia del facilitador principal (major facilitator superfamily MFS):

Los transportadores secundarios de la superfamilia MFS, al igual que los anteriores, pueden observarse en bacterias Gram positivas, Gram negativas y células eucariotas de algunos mamíferos. Representa uno de los grupos más extensos dentro de los transportadores secundarios. Estudios recientes demuestran que en general tienen una estructura conformada por dos dominios proteicos que constituyen un poro de translocación central. Tienen de 12 a 14 segmentos transmembrana, con un sitio de unión al sustrato simple, conteniendo un residuo cargado para la unión del protón que será intercambiado por dicho sustrato (Marchetti y col., 2011).

Familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (multidrug and toxic-compound extrusion MATE): están presentes en procariontas, levaduras y plantas. Estas constan de 12 segmentos transmembrana, las proteínas que se han caracterizado en procariontas funcionan intercambiando moléculas de sustrato por iones Na^+ (Sánchez, 2003).

Familia de resistencia a multifármacos pequeños (small multidrug resistance SMR): Los transportadores secundarios más pequeños conocidos pertenecen a la familia SMR. Estas proteínas contienen alrededor de 110 residuos de aminoácidos de longitud con 4 segmentos transmembrana. Dado que estas proteínas son tan pequeñas, se ha propuesto que pueden funcionar como complejos oligoméricos (Paulsen y col., 1993). Están acopladas al potencial de membrana expulsan antimicrobianos y detergentes entre otros compuestos (Sánchez, 2003).

Familia de resistencia a división por nodulación (resistance nodulation division RND): son transportadores exclusivos de microorganismos Gram negativos, poseen un espectro de acción amplio, pudiendo reconocer una amplia variedad de sustratos entre ellos antibióticos, así como también otros agentes farmacológicos, como detergentes y antisépticos. Los miembros de la superfamilia RND tienen 12 segmentos de transmembrana. Están organizados a modo de sistemas multicomponentes, en los cuales la bomba de eflujo propiamente dicha se encuentra ubicada en la membrana interna y trabaja conjuntamente con una proteína periplásmica de fusión (MFP o Membrana Fusion Protein) que actúa como nexo de unión entre la bomba de eflujo y una proteína de la membrana o porina (OMP: Outer Membrane Protein) situada, como su nombre lo dice, en la membrana externa (Marchetti y col., 2011).

El flujo a través de la membrana de los microorganismos Gram positivos no es igual al de los microorganismos Gram Negativos, ya que estos últimos poseen una membrana externa. En el caso del eflujo en sistemas de doble membrana, la droga es conducida desde el citoplasma hacia el exterior de la célula por el sistema de tres proteínas que forman el canal de salida. Estos sistemas multicomponente, incluyen a AcrAB-TolC de *E. coli* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa* perteneciente a la Superfamilia RND, con capacidad de bombear al exterior una extraordinaria variedad de antibióticos, detergentes y agentes quimioterápicos (Marchetti y col., 2011). Cabe destacar que la mayoría de los transportadores MDR de bacterias Gram negativas pertenecen a la superfamilia RND (Sánchez, 2003).

La presencia de la membrana externa en Gram negativos ha condicionado la estructura de los sistemas RND. Para que el transporte sea efectivo es necesario atravesar la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico y la membrana externa. Estos se consiguen mediante un sistema de bombeo multicomponente que suele estar constituido por 3 proteínas, una proteína transportadora (RND) en la membrana interna que está acoplada al potencial de membrana, una proteína de fusión de membrana (MFP) y una proteína en la membrana externa (OMF) (Figura 9). Generalmente, los 3 componentes están codificados en genes adyacentes formando parte de un operón (Sánchez, 2003).

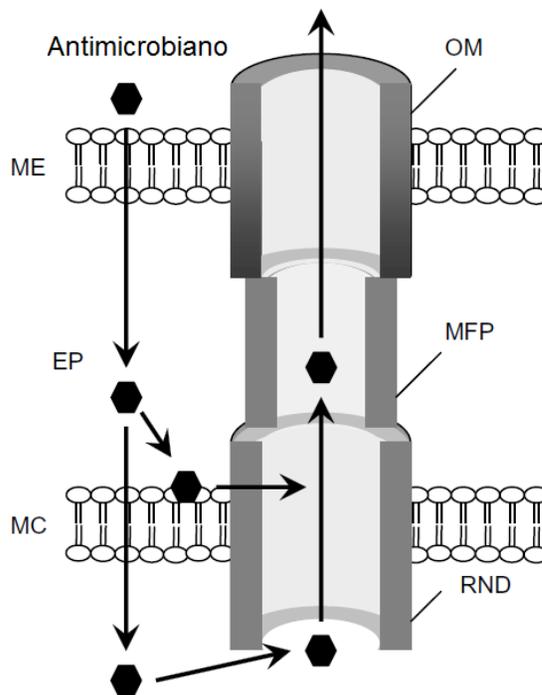


Figura 9: Representación esquemática de la estructura y función de los sistemas de eflujo RND en bacterias Gram negativas EP: espacio periplásmico, MC: membrana citoplasmática, ME: membrana externa, OM: proteína de membrana externa tipo porina. MFP: proteína periplásmica (tomado y modificado de Marchetti y col., 2011)

En *E. coli*, al ser un bacilo Gram negativo, es necesario un sistema de eflujo tripartita para expulsar el antimicrobiano hacia el medio externo. Se han

caracterizado 3 transportadores Acr (ACRidine resistances): AcrAB, AcrEF y AcrD. AcrAB y AcrEF son los sistemas de bombeo más importantes de este microorganismo desde el punto de vista de la resistencia a los antimicrobianos (tabla V) (Sánchez, 2003).

Tabla V: Clasificación de los transportadores MDR presentes en *E. coli*.

Transportador	Organismo	Sustratos
Superfamilia MFS		
TetA	<i>E. coli</i>	Tetraciclina
EmrB	<i>E. coli</i>	Tetraclorosalicilánilido, tiolactomicina
MdfA	<i>E. coli</i>	Cationes lipofílicos (bromuro de etidio, tetrafenilfosfonio, rodamina y benzalconio), antimicrobianos (tetraciclina, rifampicina, cloranfenicol y eritromicina) e isopropil beta D-tiogalactopiranosido (IPTG)
MdtD	<i>E. coli</i>	Desconocidos
EmrY	<i>E. coli</i>	Desoxicolato
Superfamilia RND		
AcrB	<i>E. coli</i>	Sales biliares y sus derivados, naranja de acridina, tetraciclina, eritromicina, ácido fusárico, novobiocina, dodecil sulfato sódico (SDS), desoxicolato y mitomicina C
AcrF	<i>E. coli</i>	Igual que AcrB
AcrD	<i>E. coli</i>	Aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, neomicina, kanamicina y tobramicina), tetraciclina, ácido nalidíxico, norfloxacino, novobiocina, SDS y desoxicolato
MdtB/MdtC	<i>E. coli</i>	Desoxicolato y novobiocina
YhiV	<i>E. coli</i>	Desoxicolato, doxorubicina, rodamina, eritromicina, cristal violeta, benzalconio y SDS
Familia SMR		
EmrE	<i>E. coli</i>	Cationes lipofílicos (bromuro de etidio y paraquat)
Familia MATE		
YdhE	<i>E. coli</i>	Fluoroquinolonas, kanamicina y estreptomicina

Tomado y modificado de Sánchez, 2003

1.5.2 Mecanismos de acción de las bombas de eflujo.

Se han formulado varias hipótesis de las posibles rutas de los transportadores, por la cuales llevan a cabo su mecanismo de acción:

1-. Hipótesis de “la aspiradora hidrofóbica”: asume que la proteína está embebida en la bicapa de la membrana, el sustrato se mueve libremente en la fase lipídica acercándose al canal central de la bomba proteica, y desde allí es “aspirado” activamente y expulsado al exterior.

2-. Hipótesis de “flippase” propone que el sustrato alcanza la bomba proteica desde dentro de la membrana y simplemente difunde al exterior.

3-. Hipótesis del “poro acuoso” este asume que la traslocación incluye el transporte del sustrato desde el citoplasma al exterior a través de poros acuosos con sitios flexibles de reconocimiento del sustrato (Marchetti y col., 2011).

El mecanismo de acción de los sistemas de eflujo puede incluir los siguientes pasos: (a) intercambio entre la droga sustrato y un protón unido a un residuo cargado en el lado interno de la membrana, (b) traslocación del sustrato tras una serie de cambios conformacionales de la proteína transportadora, que conducen al mismo a través de un canal hidrofóbico, (c) remplazo del sustrato por el protón en el medio externo y retorno al estado conformacional inicial. El resultado final es un intercambio entre el sustrato y el protón (antiporte) (Marchetti y col., 2011).

Las bombas de eflujo pueden causar resistencia a los desinfectantes, por esta razón es de gran importancia su estudio como causante de resistencia, no sólo en cepas aisladas de ambientes hospitalarios sino, de aquellas cepas provenientes de la comunidad que pueden portar resistencia a los antimicrobianos comúnmente usados como el cloro y los compuestos de amonio cuaternario.

2. ANTECEDENTES

Los desinfectantes son ampliamente usados en los centros de salud y el área doméstica para la desinfección de todo tipo de superficies. Algunos biocidas se han utilizado durante un siglo o más, mientras que otros son de uso más reciente. Se ha reportado una reducción de la susceptibilidad de las bacterias a estos agentes antimicrobianos (Russell, 2003). Los mecanismos de acción de los antibióticos son bien conocidos, mientras que aquellos de los biocidas se encuentran en investigación. Los estudios al respecto afirman que los biocidas presentan múltiples sitios blanco (Cabrera y col., 2007).

Las primeras observaciones de la actividad antimicrobiana de los compuestos de amonio cuaternario (QACs) datan de 1916, pero fue en la década de 1930 que aumentó el uso de estos agentes. Los compuestos de amonio cuaternario son biocidas ampliamente utilizados que poseen efecto antimicrobiano, pero en la actualidad la resistencia a los QACs está muy extendida entre una amplia gama de microorganismos (Hegstad y col., 2010).

El descubrimiento del cloro en 1774 por el químico sueco Scheele ayudó a marcar el comienzo de la era de la química. En 1825, el francés Labarraque reportó el uso de hipoclorito de calcio para el saneamiento general de las morgues, alcantarillado, letrinas, establos, salas de los hospitales, barcos, y en las cárceles. Dakin introdujo el uso generalizado de una solución de hipoclorito de sodio (aproximadamente 0,5%) para la antisepsia de heridas abiertas e infectadas y en 1894, Traube estableció las propiedades de purificación y desinfección de los

hipocloritos en el tratamiento del agua siendo estos los primeros usos reportados para este antimicrobiano (Rutala y Weber, 1997)

A finales de 1950 comenzaron los estudios de la resistencia en organismos Gram negativos, y especialmente *E. coli*, y durante los últimos años se han publicado varios estudios de resistencia a desinfectantes, en la mayoría de los casos de cepas de origen clínico (Nuñez y Moretton, 2006). *E. coli* es reportada como la bacteria uropatogénica de mayor incidencia tanto en la población masculina como en la población femenina (Redondo y col., 2008). Pero poco se conoce de la resistencia de estos aislados a los agentes desinfectantes.

2.1 Estudios a nivel internacional.

En el año 1980 se realizó un estudio de la resistencia a los antisépticos y antibióticos de bacterias Gram negativas aisladas de infecciones en tracto urinario, y entre estas bacterias *E. coli* es la bacteria que causa esta patología con mayor frecuencia. Entre los antimicrobianos estudiados están clorhexidina, cetrimida, glutaraldehído, nitrato fenil mercúrico, una formulación de fenol, y un antiséptico que contiene una mezcla de picloxicina, fenoxioctilo, polietoxietanol, y cloruro de benzalconio. El método empleado consiste en agregar el antimicrobiano a las placas de agar y la concentración mínima inhibitoria (MIC) se consideró como la menor concentración del agente que permitió la formación de colonias después de la incubación. Los resultados obtenidos muestran que *E. coli* fue uniformemente sensible a los antibacterianos evaluados. Las MICs de *E. coli* frente a los seis agentes esta muy por debajo de las concentraciones recomendadas de uso de

estos. Sin embargo, la situación es diferente con especies de *Proteus*, *Providencia stuartii*, y *Pseudomonas* que muestran resistencia a los antisépticos catiónicos (Stickler y Thomas, 1980).

Posteriormente también se realizó una evaluación sobre la sensibilidad de bacterias aisladas de sistemas de distribución de agua potable clorados y no clorados a este mismo antimicrobiano, reportándose que las bacterias del sistema de aguas cloradas eran más resistentes, tanto a las formas combinadas como aquellas libres de cloro que las bacterias del sistema de agua no clorado, lo que sugiere que puede haber selección para microorganismos cloro-tolerantes en aguas cloradas. En este estudio se encontraron tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas (Ridgway y Olson, 1982)

Hiraishi y colaboradores en el año 1995 estudiaron cepas aisladas de diferentes ambientes, clasificadas provisionalmente en el género *Methylobacterium*. La mayoría de los aislados derivados de los suministros de agua clorada exhibieron resistencia al cloro, mientras que solo 29 a 40% de los aislados de aire, entornos acuáticos naturales y materiales clínicos mostraron resistencia al cloro. Ninguna de las cepas ensayadas de especies de *Methylobacterium* obtenidos a partir de colecciones de cultivo exhibieron resistencia al cloro y los aislados resistentes al cloro se distribuyeron al azar entre todos los grupos. Estos resultados demuestran que existe una diversidad fenotípica y genética entre cepas resistentes al cloro dentro del género *Methylobacterium* (Hiraishi y col., 1995).

En un estudio realizado por Rutala y colaboradores en 1997, se evaluó la resistencia a desinfectantes (cuyo compuesto activo era el amonio cuaternario) de cepas bacterianas resistentes y sensibles a distintos antibióticos (incluyendo cepas de *E. coli*). Los resultados que se obtuvieron en el estudio fueron los siguientes: en presencia de QACs dilución de 1:64 de las cepas de *E. coli* que muestran resistencia a antibióticos, 4 son resistentes al desinfectante y de las cepas que son sensibles encontraron que 23 muestran resistencia al desinfectante a esa dilución; en presencia de la dilución de 1:32 las cepas de *E. coli* que muestran resistencia a los antibióticos, 1 es resistente al desinfectante y de las cepas que son sensibles, 14 muestran resistencia al desinfectante a esa dilución. No se encontró resistencia cruzada entre antibióticos y desinfectantes.

En un estudio de 2 cepas isogénicas de *E. coli*, los autores evaluaron la resistencia al cloro en respuesta a la tasa de oxigenación y la deficiencia de nutrientes, encontrando que la cepa mutante de *E. coli* deficiente en el antioxidante GSH no fue más sensible para el oxidante que su cepa progenitora, cuando las bacterias se cultivaron con una tasa baja de O₂. Al aumentar la oxigenación aumentó de la resistencia de la cepa madre al cloro, mientras que la resistencia de la cepa deficiente se mantuvo sin cambios. GSH desempeña un papel clave en la defensa celular contra el cloro, ya que actúa como un eliminador de agentes oxidantes. (Saby y col., 1999).

Un trabajo del año 2000 realizado en Brasil por Guimarães y colaboradores evaluó la resistencia a desinfectantes de cepas de ambientes hospitalarios que tenían previa evaluación de resistencia a diferentes antibióticos. Entre los veintinueve

patógenos resistentes a los antibióticos que se evaluaron, 11 cepas (52%) fueron resistentes a los QACs y entre estas cepas resistentes se encontraba una cepa de *E. coli*.

Bischoff y colaboradores para el año 2001, realizaron un estudio para evaluar la resistencia a desinfectantes en bacterias del género *Enterococcus*, debido a su importancia como patógenas nosocomiales. Se evaluaron muestras de *Enterococcus faecalis* de sangre y de heces de pacientes hospitalizados, además estudiaron muestras de heces de animales de granja, y de los alimentos (leche y productos lácteos; carne y productos cárnicos). Se determinó la presencia de los genes *qacA*, *qacB*, *qacC*, *smr [qacC + qacD]*, *qacED1*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* mediante PCR. La resistencia de los aislados a QAC y antibióticos se evaluó mediante microdilución. Los resultados obtenidos en este estudio fueron: en 4 cepas de 585 (0,7%) de *E. faecalis* se detectaron genes de resistencia a QAC, los genes *qacA / B* se encontraron en 2 cepas, una cepa de ganado y un aislado de la sangre humana; mientras que las 2 cepas restantes dieron positivas para *smr (qacC + qacD)*, una cepa de materia fecal humana y en una cepa de queso. Los genes *qacED1*, *qacG*, *qacH* y *qacJ* no fueron detectados (Bischoff y col., 2001).

En otro estudio se realizaron 2 tipos de pruebas, un método basado en la difusión en agar del antimicrobiano y un método de contacto directo. En este último el hipoclorito de sodio (2%) tuvo un efecto antimicrobiano total, inhibiendo el crecimiento de cinco microorganismos estudiados: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*, todas cepas de microorganismos de referencia obtenidos de American

Type Culture Collection. Por el método de difusión en agar *Bacillus subtilis* fue el único microorganismo capaz de crecer en presencia del antimicrobiano. Estos resultados permiten inferir que el hipoclorito de sodio no tiene efecto esporicida (Estrela y col., 2003).

Un estudio evaluó la resistencia a QAC mediante una modificación de la versión del método europeo para probar la actividad bactericida de los desinfectantes químicos. Las cepas de *Pseudomonas* muestran resistencia a QAC y cierta resistencia cruzada a varios agentes antibacterianos, con la excepción de los desinfectantes que contienen cloramina, glutaraldehído o ácido peracético. Las cepas de *Pseudomonas* pueden sobrevivir el aumento de las concentraciones de compuestos de amonio cuaternario (QAC), pero las cepas resistentes se pueden eliminar con desinfectantes químicamente no relacionados (Langsrud y col., 2003)

Se realizó un estudio de la resistencia a distintos desinfectantes de aislados nosocomiales en la ciudad de Habana en el año 2006, en el cual se encontraron diferencias altamente significativas entre los resultados con los microorganismos Gram negativos y los Gram positivos. Las bacterias Gram negativas, en su totalidad, constituyeron las cepas bacterianas con mayor resistencia (Rodríguez y col., 2006).

Sena y colaboradores en el año 2006 realizaron un estudio en biopelículas para evaluar la actividad antimicrobiana de hipoclorito de sodio 2,5% y 5,25% y de clorhexidina 2,0% en trabajos de endodoncia. Las biopelículas de especies individuales de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*,

Prevotella intermedia, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* y *Fusobacterium nucleatum* se sumergieron entonces en las sustancias antimicrobianas por un tiempo de 30 s, y también para 5, 10, 15, 30 y 60 min, con y sin agitación mecánica. Después de cada período de tiempo, los filtros de membrana se transfirieron a neutralizante y continuación el inóculo se diluyó y se sembraron en medio de agar con sangre de oveja al 5%. Se calcularon las unidades formadoras de colonias. Los autores reportan que la agitación mecánica promueve la eficacia de los agentes antimicrobianos, lo que resulta en menos tiempo para eliminar los mismos microorganismos, a excepción de *S. aureus* con 2,5% NaOCl. Los agentes antimicrobianos en la presentación líquida, especialmente NaOCl 5,25% y clorhexidina 2%, mataron a los microorganismos ensayados más rápidamente. *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* y *F. nucleatum* fueron eliminados en 30 s por todos los agentes antimicrobianos, con o sin agitación.

En un estudio realizado en el año 2007, reportan a *E. coli* como el agente bacteriano que con más frecuencia causa infecciones del tracto urinario, además se evaluó la resistencia de estas cepas a trimetoprim-sulfametoxazol y ampicilina, obteniendo como resultado que del total de urocultivos estudiados el 45% de la bacterias aislada fue *E. coli*. El 77% de estas cepas fueron de origen comunitario. El 72% de las bacterias fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y el 80% a la ampicilina (Aguirre y col., 2007)

Chaidez y colaboradores en el 2007, evaluaron la actividad desinfectante del QAC frente a *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Se emplearon diferentes valores de

turbidez de las cepas estudiadas y evaluaron 30 y 120 seg como tiempos de contacto con el desinfectante. El porcentaje de reducción de *E. coli* fue significativamente mayor en la solución menos turbia, mientras que la turbidez no afectó la reducción de *Staphylococcus aureus*. Estos investigadores concluyeron que *E. coli* es más resistente al tratamiento con QAC que *S. aureus*.

En un estudio se evaluó el efecto de la reducción de la actividad bactericida de cuatro desinfectantes debido a la presencia de materia orgánica. Los desinfectantes evaluados fueron: gluconato de clorhexidina (CHX), cloruro de bencetonio (BZT), cloruro de benzalconio (BZK), y alquil diaminoetil clorhidrato de glicina (ADH) todos con aislados clínicos de *Acinetobacter*. La actividad bactericida de los cuatro desinfectantes se evaluó mediante: medidas concentración mínima inhibitoria, mediciones y ensayos de concentración bactericida mínima y ensayos de adaptación, encontrando que el efecto bactericida de los cuatro desinfectantes se redujeron considerablemente en la presencia de materia orgánica (Kawamura-Sato y col., 2008).

Se realizó un estudio para evaluar la resistencia a siete biocidas en una colección de nueve cepas de *Escherichia coli*, incluyendo cepas verotoxigénicas y cepas portadoras de resistencia a beta-lactámicos. Los biocidas evaluados fueron: derivados de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio cetrimida, hexadecilpiridinio), biguaninas (clorhexidina), bis-fenoles (hexachlorofeno triclosan) y agentes oxidantes (p3-oxonia active). El método para determinar la concentración mínima inhibitoria fue la técnica de microtitulación. Los resultados

obtenidos muestran que el triclosan, el hexadecilpiridinio y la cetrimida, seguido del cloruro de benzalconio, fueron los biocidas más eficientes (López y col., 2010)

Se realizó un estudio en muestras tomadas de 153 pacientes con bacteriemia por *E. coli*, para evaluar la acción antimicrobiana de compuestos de amonio cuaternario y algunos antibióticos. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los antibióticos evaluados, y de los antimicrobianos: cloruro alquil dimetil bencil amonio (ADBAC) y cloruro de didecil dimetil amonio (DDAC), se determinaron por el método de dilución en agar. La capacidad de producción de biopelículas se ensayó usando el método de cristal violeta. La gravedad de la bacteriemia y la evolución de los pacientes eran independientes de las CMI encontradas para las muestras aisladas de los pacientes evaluados. Los resultados obtenidos demuestran que existe una relación epidemiológica entre los valores de CMI de QAC en aislados clínicos de *E. coli* y la resistencia a los antibióticos (Buffet-Bataillon y col., 2011).

Un estudio realizado para comparar la eficiencia de desinfección de 3 tipos de biocidas, entre estos el cloro, en cepas de *E. coli*, arrojó como resultado que el cloro es el agente más efectivo contra este microorganismo en comparación con los otros compuestos evaluados (jabón antibacterial y etanol), pero cabe destacar que a tiempos de exposición cortos se observa resistencia, aunque posee la mayor tasa de reducción de la viabilidad (<http://www.cte.ku.edu> consultado el 22 de abril de 2012).

Rivera y colaboradores en 2006, realizaron un estudio en bacterias pertenecientes a la especie *E. coli* frente a diversos contaminantes del medio ambiente, entre estos, biocidas como fenol y formaldehído. Los resultados que obtuvieron demuestran que estas bacterias exhiben una viabilidad considerable frente a la exposición a los contaminantes, en comparación a los grupos que usaron como control. Este estudio demostró que la resistencia a diversos contaminantes está distribuida en cepas de *E. coli*.

2.2 Estudios a nivel nacional.

En un trabajo reportado en el 2005, se evaluó la actividad micobactericida de desinfectantes disponibles en el mercado venezolano, registrados como tuberculicidas. Entre estos desinfectantes se evaluaron productos con compuesto de amonio cuaternario como agente activo. Obteniendo como resultado que los desinfectantes cuyo componente son QACs, no son efectivos sobre micobacterias, con un tiempo de exposición de 60 minutos (Bello y col., 2005).

El bromuro de lauril dimetil bencil amonio (LDBAB) es un compuesto de amonio cuaternario ampliamente utilizado en las Antillas, Chile, Colombia, Brasil, Bolivia, Panamá, Perú y Venezuela como una solución al 10% o el 0,16%. Los mismos autores del trabajo anterior evaluaron la presunta actividad esporicida y tuberculocida de estas dos formulaciones de LDBAB. Los resultados que se obtuvieron son que tanto el compuesto al 10% como al 0,16% de LDBAB no tiene actividad esporicida contra *Bacillus athropaeus* con 10 horas de tiempo de

contacto y tampoco lograron una reducción de la viabilidad de las micobacterias después de 1 hora de tiempo de contacto (Bello y col., 2008).

En Caracas para el año 2008, se evaluó la resistencia de aislados de origen hospitalario y de origen ambiental. Del total de los aislados bacterianos estudiados, el 67% de ellos resultó resistente a la acción de los agentes desinfectantes ensayados. De estos, el 50% de los aislados bacterianos fueron resistentes a desinfectantes cuyo agente activo pertenece a la familia de los QACs. Los aislados ambientales presentaron mayores niveles de resistencia (Guariglia y col., 2008).

En el año 2007, se realizó un estudio donde se evaluaron muestras de pacientes ambulatorios de las cuales 64% dieron positivas para infección urinaria. *E. coli* representó el 67% de la población, con un 32% de resistencia al antibiótico trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT). Este porcentaje de cepas resistentes a SXT transfirieron al menos una molécula plasmídica, confirmando a las cepas receptoras resistencia al menos a 4 antibióticos, pudiendo también transferir resistencia a otros antimicrobianos como los desinfectantes (Angiolillo, 2007).

Cortesia y colaboradores en el 2010, estudiaron la supervivencia de los aislamientos clínicos y ambientales de distintas especies de micobacterias usando como tiempo de contacto 20 min, 60 min o 24h, para la exposición a QAC, y las bacterias sobrevivientes fueron luego re-expuestas a los QAC para ver si el porcentaje de bacterias sobrevivientes habían aumentado. Las bacterias resistentes a los QAC se volvieron a sembrar en medio selectivo y se repitió la

prueba de sobrevivencia a QAC. Los resultados obtenidos muestran que la frecuencia de los sobrevivientes fue, 1 en 105 con las bacterias *Mycobacterium smegmatis*, pero 0,1 de cada 100 con las otras micobacterias estudiadas. Diferentes cepas ambientales y clínicas tuvieron similares MICs frente a QAC, y las bacterias sobrevivientes a QAC fueron cada vez más resistentes (Cortesia y col., 2010).

En el 2011, Ramos y Alonso realizaron un estudio de cepas aisladas tanto de pacientes hospitalizados como del medio ambiente. Se evaluó la resistencia a desinfectantes cuyo compuesto activo era un amonio cuaternario. De las 32 cepas estudiadas, 18 resultaron ser resistentes a la acción del compuesto de amonio cuaternario, y 14 cepas fueron sensibles. De las 23 cepas de bacterias Gram negativas evaluadas, 10 resultaron ser resistentes (incluyendo entre éstas a *E. coli*). Las cepas ambientales presentaron mayor porcentaje de resistencia a QAC que las aisladas de pacientes (Ramos y Alonso, 2011).

Los trabajos anteriormente expuestos son solo algunos de los reportados, y demuestran el incremento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Estos reportes acrecentan la necesidad de realizar más estudios de la resistencia bacteriana a los desinfectantes, especialmente de aquellos productos de mayor uso hospitalario y en el área doméstica.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de los desinfectantes es aplicado en todas las áreas del que hacer humano (doméstica, centros hospitalarios, industria alimentaria, entre otras). En las últimas décadas, se ha observado que después de un tratamiento continuo, las superficies no se desinfectan adecuadamente, siendo esto un problema que se agrava cuando las bacterias presentes son o pueden ser patógenas, como en el caso de *E. coli* que es la mayor causante de infecciones en el tracto urinario. Esto sucede porque constantemente están siendo seleccionadas bacterias resistentes a los biocidas utilizados de rutina. La causa principal de este problema radica en el uso inadecuado de los productos desinfectantes, tales como: no dejarlo actuar el tiempo indicado, ni con la concentración ni condiciones recomendadas, usando concentraciones subinhibitorias.

La actividad de realizar estudios como el propuesto en este proyecto, para analizar bacterias patógenas aisladas de pacientes de la comunidad, que presenten resistencia a desinfectantes de uso común, así como evitar los mecanismos por los cuales el microorganismo es resistente, es de gran importancia para promover la eliminación del microorganismo.

El cloro es el desinfectante de mayor uso en el área doméstica para la desinfección de superficies, por esto es necesario estudiar el fenotipo de resistencia que puedan presentar las bacterias que portan los pacientes no hospitalizados, y que no están sometidas a una presión selectiva constante. Los QACs son los biocidas de mayor uso en centros hospitalarios en donde se presenta el mayor porcentaje de bacterias resistentes, sin embargo, no se conoce mucho sobre el mecanismo de resistencia a estos agentes que se presenta en los

aislados bacterianos de nuestro país. Se han realizado estudios para determinar la presencia de genes cuyos productos están involucrados en resistencia a los antibióticos, pero no hay reportes nacionales sobre los genes cuyos productos protegen a las bacterias de los efectos de los biocidas. Al conocer los productos proteicos involucrados, se podrá determinar el posible mecanismo de resistencia y adoptar las medidas pertinentes para frenar las infecciones causadas por bacterias resistentes.

4. OBJETIVOS

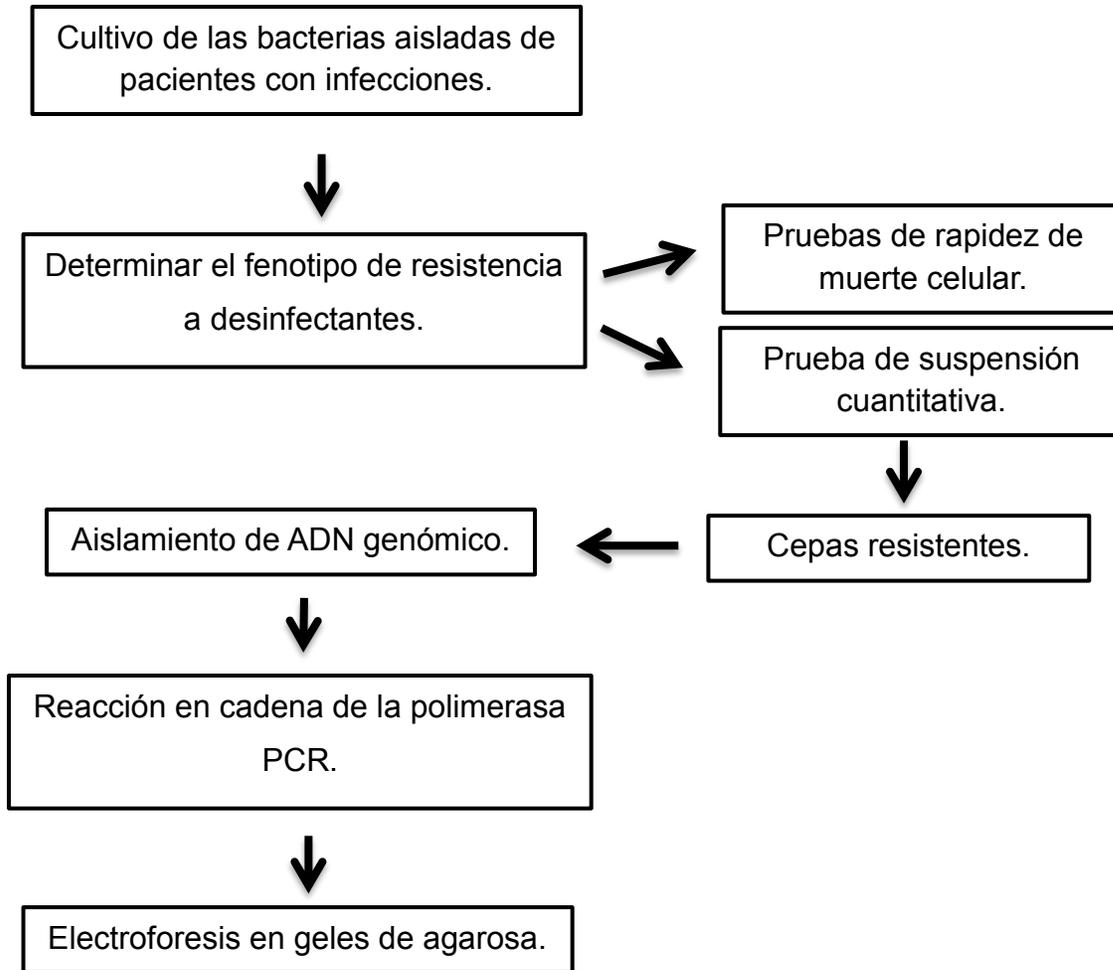
Objetivo general.

Determinar el fenotipo de resistencia a desinfectantes de uso clínico y de uso doméstico en muestras de *Escherichia coli* aisladas de pacientes de la comunidad con infecciones en el tracto urinario, y determinar la presencia de genes que codifican para bombas de eflujo como posibles responsables del fenotipo de esta resistencia.

Objetivos específicos.

1. Determinar el fenotipo de la resistencia a desinfectantes en muestras bacterianas aisladas de pacientes ambulatorios con infecciones urinarias.
2. Evaluar la presencia de genes que codifican para bombas de eflujo.

5. PLAN DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas.

Las cepas bacterianas que se estudiaron se encontraban almacenadas en punciones en el Laboratorio de Biología de Plásmidos del IBE. Estas se aislaron de muestras de urocultivos de pacientes ambulatorios, que presentaban infecciones en el tracto urinario, y asistieron a consulta en el Centro Médico Docente La Trinidad en Caracas, desde el 15 de Mayo al 18 de Julio del 2006. Estos aislados fueron previamente identificados y caracterizados como pertenecientes al género de *E. coli* y presentan resistencias a Trimetoprim/Sulfametoxazol SXT y a otros antibióticos (tabla VI).

La cepa que se utilizó como control negativo para los ensayos fenotípicos fue *E. coli* K12 J62-2 número 131, del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), de genotipo: F^- , RIF^+ , his^- , lac^- , pro^- , trf^- .

Tabla VI: Cepas de *E. coli* evaluadas y fenotipo de resistencia a antibióticos.

Cepa	Antibióticos		
	AMP	SXT	RIF
J62-2	S	S	R
3171	S	R	S
3280	R	R	S
3438	R	R	S
3574	R	R	S
3663	S	R	S
3719	S	R	S
3741	R	R	S
3790	R	R	S
3799	R	R	S
3875	R	R	S
3920	R	R	S
3979	R	R	S
3992	R	R	S
4375	R	R	S
4569	R	R	S
4662	R	R	S

Ampicilina (AMP), Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT) y Rifampicina (RIF).
R: resistente. S: sensible

6.2 Reactivos.

Los reactivos que se utilizaron son Grado Biología Molecular, adquiridos en las casas comerciales Sigma, Amresco, Promega, Invitrogen o Plusone. El material y todos los medios y soluciones fueron esterilizados en la autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 min. Una vez esterilizado todo el material se trabajó bajo la llama de un mechero o en condiciones de esterilidad.

6.3 Desinfectantes.

Los desinfectantes evaluados, el compuesto activo y las concentraciones de estos, se muestran en la tabla VII. El tiempo de exposición utilizado para ambos desinfectantes fue de 5 minutos.

Tabla VII: Desinfectantes evaluados.

Compuesto activo	Concentración del compuesto activo en el producto comercial	Dilución evaluada del producto comercial	Concentración del compuesto activo
Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio	10%	10%	1%
		100%	10%
Hipoclorito de sodio	3,5%	5%	0,175%
		10%	0,35%
		15%	0,525%
		20%	0,7%
		30%	1,05%
		50%	1,75%

6.4 Neutralizante.

El medio Lethen está formulado según las prescripciones de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC), para el ensayo de la acción bactericida en los amonios cuaternarios.

La composición específica del medio Lethen para un 1L de medio es: Peptona de carne 10 gramos, extracto de carne 5 gramos, extracto de levadura 2 gramos, lecitina de soya 0,7 gramos, cloruro de sodio 5 gramos, bisulfito de sodio 0,1 gramos y 5 mL de Tween 80.

6.5 Determinación del fenotipo de resistencia.

Las pruebas que se realizaron para determinar el fenotipo de resistencia a desinfectantes son las recomendadas por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC).

6.5.1 Protocolo de la prueba de rapidez de muerte celular.

Partiendo de una colonia previamente aislada se inocularon 2 mL de caldo LB y se incubaron toda la noche con agitación. A partir de este cultivo bacteriano se tomaron 100 μ L del cultivo de cada cepa y se pusieron en contacto con 900 μ L del desinfectante a la concentración de prueba, por un tiempo de 5 minutos. Luego de transcurrido ese tiempo se transfirieron 100 μ L de esta mezcla a 900 μ L de la solución neutralizante. Se incubaron por 48 horas a 37° C, con agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se observó a simple vista si había turbidez en el medio, como indicativo de crecimiento microbiano.

6.5.2 Protocolo de la prueba de suspensión cuantitativa.

Partiendo de una colonia previamente aislada se inocularon 2 mL de caldo LB y se incubaron toda la noche con agitación. A partir de este cultivo bacteriano se tomaron 100 μ L del cultivo de cada cepa y se pusieron en contacto con 900 μ L del desinfectante a la concentración de prueba, por un tiempo de 5 minutos. Luego de

transcurrido ese tiempo se transfirieron 20 μL de esta mezcla a 1980 μL la solución neutralizante. Se dejó en reposo durante 5 minutos y luego de transcurrido este tiempo se realizaron diluciones seriadas en solución neutralizante desde 10^{-1} hasta 10^{-3} . Paralelamente, se realizaron diluciones seriadas en solución salina del cultivo puro, control, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Se sembraron 50 μL mediante extensión con rastrillo de cada dilución y la mezcla sin diluir, en placas de agar LB suplementado con el antibiótico al cual la cepa presenta resistencia. Las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) tanto del inóculo inicial como aquellas que estuvieron expuestas a las diluciones de los desinfectantes. Se calculó el título en cada caso mediante la fórmula:

$$\text{Título} = \frac{\text{UFC} \times \text{dilución}}{\text{Volumen de siembra}}$$

UFC= unidades formadoras de colonia
Dilución: dilución realizada.

Luego se calculó el Log10 de reducción de viabilidad ($\log_{10}\text{ RV}$) mediante la siguiente formula:

$$\text{Log}_{10}\text{ RV} = \log_{10}\text{ de UFC/mL}_{\text{AD}} - \log_{10}\text{ de UFC/mL}_{\text{DD}}$$

donde AD= antes de la acción del desinfectante y DD=después de la acción del desinfectante. Se consideran sensibles aquellas cepas que presentan Log_{10} de reducción de viabilidad >5 a los 5 minutos de exposición.

Los controles que se realizaron previo a las pruebas fenotípicas fueron:

Control de neutralización: con esta prueba se comprobó que el neutralizante detiene la acción del desinfectante evaluado. Se mezclaron 100 µL de solución desinfectante con 800 µL de neutralizante; se dejó en reposo 5 minutos, posteriormente se añadieron 100 µL de una suspensión bacteriana sensible al efecto del agente y se dejó el tiempo de exposición evaluado (5 min). Se sembraron en placas de agar LB, y se incubaron a 37 °C por 24 horas, y se observó si hubo o no crecimiento.

Control de toxicidad del neutralizante: se realizó para comprobar que el neutralizante no es tóxico para las cepas bacterianas utilizadas. Se tomaron 100 µL de cada suspensión bacteriana y se transfirieron a 900 µL de solución neutralizante, se incubaron a 37 °C por 24 horas. Se evaluó el crecimiento bacteriano a través de la observación a simple vista de la turbidez del medio.

6.6 Aislamiento de ADN genómico de los cultivos bacterianos.

La lisis celular y la extracción de ADN total de la célula se realizaron mediante el método de ebullición. Se inocularon 2 mL de caldo LB con la cepa bacteriana que mostró resistencia al desinfectante, y se incubaron toda la noche con agitación. A partir de este cultivo bacteriano se tomaron 200 µL y se mezclaron con 800 µL de agua MiliQ, se procedió a hervir la mezcla durante 10 minutos, luego se centrifugó por 10 minutos a 12000 xg. Se tomó el sobrenadante que contiene el ADN y se almacenó a -20 °C (Guzmán y Alonso, 2008).

6.7 Detección de genes que codifican para bombas de eflujo.

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa PCR para determinar la presencia de genes que codifican bombas de eflujo que confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternarios QAC, y se realizó para aquellas muestras de aislados que mostraron resistencia a los desinfectantes evaluados. En la tabla VIII se muestra la secuencia de los iniciadores específicos a empleados para amplificar los genes.

Tabla VIII: Nombre, secuencia y tamaño de los iniciadores de los genes *qac* que codifican para bombas de eflujo.

Gen a identificar	Nombre del iniciador	Secuencia (5'---3')	Tamaño aprox	Referencia
<i>qacA/B</i>	<i>qacA/B F</i>	CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT	416 pb	Wang y col., 2008
	<i>qacA/B R</i>	CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG		
<i>qacEΔ1</i>	<i>qacEΔ1F</i>	TAGCGAGGGCTTTACTAAGC	300pb	Wang y col., 2008
	<i>qacEΔ1R</i>	ATTCAGAATGCCGAACACCG		
<i>qacG</i>	<i>qacG F</i>	CAACAGAAATAATCGGAACT	274pb	Bjorland y col., 2005
	<i>qacG R</i>	TACATTTAAGAGCACTACA		
<i>qacH</i>	<i>qacH F</i>	ATAGTCAGTGAAGTAATAG	294pb	Bjorland y col., 2005
	<i>qacH R</i>	AGTGTGATGATCCGAATGT		
<i>qacJ</i>	<i>qacJ F</i>	CTTATATTTAGTAATAGCG	305pb	Bjorland y col., 2005
	<i>qacJ R</i>	GATCCAAAACGTTAAGA		

Como control para certificar que el lisado que contiene ADN apto para la PCR, se realizó la amplificación del gen que codifica para un fragmento de la secuencia conservada del rRNA 16S. La secuencia de los iniciadores utilizados es la siguiente: U1: 5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3', que corresponden a los nucleótidos 518 a 537 del gen 16S rRNA. U2: 5'ATCGG(C/T)TACCTTGT

TACGACTTC 3'; que corresponden a los nucleótidos 1513 a 1491 del gen 16S rRNA (Jang y col., 2000).

Para evaluar la presencia de los genes que codifican las bombas de eflujo mediante PCR, se utilizó como control positivo el ADN de cepas que previamente se les había evaluado la presencia del gen correspondiente, gentilmente donados por la licenciada Yusibeska Ramos. Para los genes *qacB* y *qacEΔ1* se usó como control positivo la cepa AB9 de *Acinetobacter baumannii* mientras que para el gen *qacG* se usó la cepa AU21 de *Acinetobacter baumannii*. Cabe destacar que para los genes *qacH* y *qacJ* no se tiene control positivo almacenado en el laboratorio.

6.7.1 Condiciones de la reacción de PCR

El volumen final de la PCR fue 25 μ L, de los cuales 1 μ L es de la muestra de ADN y 24 μ L de la mezcla de reactivos previamente preparada (tabla IX). Como control negativo se preparó una reacción con todos los reactivos menos el ADN molde. Como control de especificidad positivo se usó ADN de una cepa bacteriana con el gen a amplificar presente en su genoma y como control de especificidad negativo se usó *E. coli* K12 J62-2 número 131, del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), de genotipo: F^- , RIF^+ , his^- , lac^- , pro^- , trf^- , que no contiene los genes que codifican para bombas de eflujo presentes en su genoma.

Tabla IX: Reactivos utilizados en PCR.

Reactivos	[inicial]	[final]	Volumen para 25 μ L (μ L)
Buffer	10X	1X	2,5
MgCl ₂	50mM	1,5 mM	0,75
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
Iniciador 1	10mM	0.5 μ M	1,25
Iniciador 2	10mM	0,5 μ M	1,25
Taq polimerasa	5U/ μ L	1 U/ μ L	0,2
Agua ultrapura	-	-	17,55
ADN	-	-	1

La PCR se realizó en un termociclador modelo Mastercycler Personal, de la casa comercial Eppendorf. Al finalizar la PCR, las muestras se almacenaron a -20 °C.

Las condiciones de amplificación de los genes que codifican para bombas de eflujo que confieren resistencia a QACs se describen en la tabla X.

Tabla X: Condiciones de amplificación de los genes *qac*.

Gen	Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos.
<i>qacAB</i>	Calentamiento	94	2min	1
	Desnaturalización	94	30seg	
	Hibridación	45	1min	30
	Extensión	72	1min	
	Extensión final	72	7min	1
<i>qacEΔ1</i>	Calentamiento	93	3min	1
	Desnaturalización	93	30seg	
	Hibridación	53	30seg	35
	Extensión	72	1min	
	Extensión final	72	10min	1
<i>qacG</i> <i>qacH</i> <i>qacJ</i>	Calentamiento	95	3min	1
	Desnaturalización	95	1min	
	Hibridación	48	45seg	30
	Extensión	72	1min	
	Extensión final	72	5min	1

6.8 Electroforesis en geles de agarosa.

Para el gel de electroforesis, se preparó la agarosa en buffer TBE 1X (Tris-HCl 0,089M, ácido bórico 0,089M, EDTA 0,002M, pH 8,0).

Una vez polimerizado el gel de agarosa, se colocó en la cámara de electroforesis, se añadió el buffer TBE 1X. Se procedió a cargar la muestra mezclada con un buffer de carga (azul de bromofenol 0,25%, xylene cyanol 0,25% y glicerol 50%). En un bolsillo del gel se cargó el marcador de peso molecular Axygen 100pb. Se inició la corrida electroforética y al finalizarla se procedió a la visualización del gel.

6.8.1 Visualización del gel.

Se trató con bromuro de etidio. El procedimiento para visualizar los productos de PCR es el siguiente: Se dejó 15 minutos aproximadamente en bromuro de etidio, y luego se pasó a agua destilada durante 5 minutos para quitar el exceso.

6.8.2 Registro de la imagen del gel.

Luego del tratamiento, el gel se observó en un equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000, de la casa comercial BioRaD, y la imagen obtenida fue registrada.

7. RESULTADOS

Con el fin de caracterizar las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes ambulatorios con infecciones en el tracto urinario, se procedió a realizar las pruebas fenotípicas de resistencia a desinfectantes de uso común en el área doméstica (cloro) y en el área hospitalaria (QAC), a distintas concentraciones. Luego a las cepas resistentes se le evaluó la presencia de bombas de eflujo como posibles causantes del fenotipo de resistencia.

7.1 Comprobación de fenotipos.

A las cepas de *E. coli* señaladas en la tabla VI, aisladas de muestras de urocultivos de pacientes ambulatorios que presentaban infecciones en el tracto urinario, se les evaluó la capacidad de crecer en caldo- LB y agar- LB. Se confirmó la capacidad de las cepas previamente reportadas como resistentes al antibiótico ampicilina (tabla VI) de crecer en presencia del mismo, ya que este marcador será utilizado como factor de selección de los diferentes aislados estudiados. Esta evaluación se realizó por siembra directa en placas de agar-LB suplementadas con el antibiótico. Se comprobó la capacidad de todas las cepas de crecer tanto en medio líquido como en medio sólido en presencia del marcador de selección.

7.2 Determinación del fenotipo de resistencia.

En este estudio se evaluaron dos agentes con propiedades desinfectantes, el cloro el cual es el de mayor uso en el área doméstica y un compuesto de amonio cuaternario que es mayoritariamente usado en centros de salud. La determinación del fenotipo de resistencia de los aislados bacterianos estudiados se realizó mediante dos pruebas: la rapidez de muerte celular, en la cual solo se observa la

turbidez del medio después de la exposición al desinfectante e incubación por 48 horas, como indicativo del crecimiento microbiano, y la suspensión cuantitativa en la cual se calcula el título bacteriano antes y después de la exposición al desinfectante. Con los datos obtenidos de los títulos bacterianos se calculó el log10 de la reducción de la viabilidad, que es un indicativo de la resistencia bacteriana, según se indicó en la sección de materiales y métodos, punto 6.5.2. Los controles efectuados para estas pruebas fenotípicas son: el control de toxicidad (el cual comprueba que el desinfectante no es tóxico para las cepas evaluadas) y el control de neutralización (el cual comprueba que el neutralizante es capaz de inhibir la acción del desinfectante). Los resultados de estas pruebas se muestran en las Tablas XI y XII.

Tabla XI: Control de toxicidad del neutralizante.

Cepa	Crecimiento en el Neutralizante
J62-2	+
3171	+
3280	+
3438	+
3574	+
3663	+
3719	+
3741	+
3792	+
3799	+
3875	+
3920	+
3979	+
3992	+
4375	+
4569	+
4662	+

+: Presencia de crecimiento.

-: Ausencia de crecimiento.

En la tabla XI se observa que todos los aislados bacterianos ensayados, incluyendo el control *E. coli* J62-2 fueron capaces de crecer en el caldo Letheen

modificado, medio empleado como neutralizante en las pruebas, lo cual nos permitió comprobar que el medio neutralizante no es tóxico para las cepas a evaluar.

Tabla XII: Control de neutralización de los desinfectantes a las diluciones evaluadas.

Desinfectantes.	Dilución de los desinfectantes evaluados.	Crecimiento de <i>E. coli</i> J62-2
Cloro	5%	+
	10%	+
	15%	+
	20%	+
	30%	+
QAC	50%	+
	10%	+
	100%	+

+: Presencia de crecimiento.

-: Ausencia de crecimiento.

En la tabla XII se observan los resultados obtenidos en el control de neutralización. En todas las dilución evaluadas (5%, 10%, 15%, 20%, 30% y 50% para cloro y 10% y 100% para QAC) la cepa *E. coli* J62-2, sensible a ambos desinfectantes, fue capaz de crecer luego de estar en contacto el desinfectante con el neutralizante para inhibir su efecto, comprobando de esta manera que el neutralizante si es capaz de inhibir la acción de los desinfectantes a las concentraciones evaluadas.

Los resultados obtenidos mediante las pruebas de rapidez de muerte celular y suspensión cuantitativa se muestran en las tablas XIII, XIV, XV y XVI

Tabla XIII: Prueba de rapidez de muerte celular con QAC diluido al 10%.

Cepa	Repetición	Crecimiento QAC 10%
J62-2	5	-
3171	5	+
3280	2	-
3438	2	-
3574	5	+
3663	2	-
3719	2	-
3741	2	-
3792	2	-
3799	2	-
3875	2	-
3920	2	-
3979	4	-
3992	5	+
4375	2	-
4569	5	+
4662	2	-

+: Presencia de crecimiento.

-: Ausencia de crecimiento.

Repetición: Número de veces que se realizó la prueba para esa cepa.

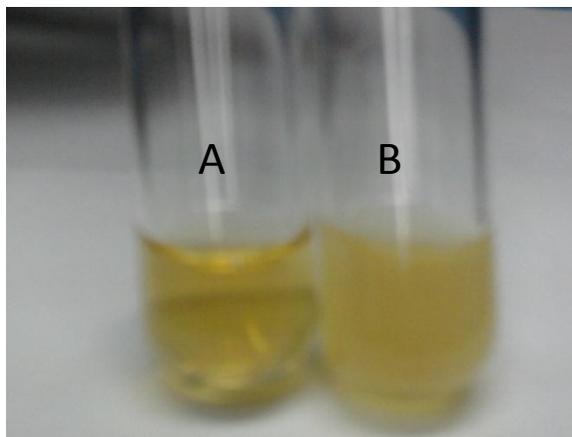


Figura 10: Fotografía de tubos de ensayo de la prueba de rapidez de muerte celular. A: tubo de ensayo con ausencia de crecimiento. B: tubo de ensayo con presencia de crecimiento.

En la tabla XIII se muestran los resultados obtenidos para la prueba de rapidez de muerte celular con QAC 10%, es decir, el producto comercial diluido 1/10 (quedando el compuesto activo al 1%). De las 16 cepas evaluadas, 4 cepas fueron capaces de crecer luego de la exposición durante 5 minutos al desinfectante a esa concentración, es decir el 25% de las cepas son resistentes. Cabe destacar que el

control negativo *E. coli* J62-2 no creció, comprobando así la efectividad del desinfectante contra cepas que no presentan el fenotipo de resistencia.

Tabla XIV: Prueba de rapidez de muerte celular con QAC al 100%.

Cepa	Repetición	Crecimiento QAC 100%
J62-2	2	-
3171	2	-
3280	2	-
3438	2	-
3574	2	-
3663	2	-
3719	2	-
3741	2	-
3792	2	-
3799	2	-
3875	2	-
3920	2	-
3979	2	-
3992	2	-
4375	2	-
4569	2	-
4662	2	-

+: Presencia de crecimiento.

-: Ausencia de crecimiento.

Repetición: Número de veces que se realizó la prueba para esa cepa.

En la tabla XIV se muestran los resultados obtenidos para la prueba de rapidez de muerte celular con QAC al 100%, es decir, el producto comercial sin diluir (compuesto activo 10%). Los resultados obtenidos demostraron que de las 16 cepas evaluadas ninguna fue capaz de crecer luego de la exposición durante 5 minutos al desinfectante a esa concentración, permitiendo sugerir que el 100% de las cepas evaluadas es sensible. Cabe destacar que el control negativo *E. coli* J62-2 no creció, comprobando así la efectividad del desinfectante contra cepas que no poseen resistencia.

Tabla XV: Prueba de rapidez de muerte celular con cloro diluido al 5% y al 10%

Cepa	Repeticiones	Crecimiento	
		5%	10%
J62-2	3	-	-
3171	3	-	-
3280	3	-	-
3438	3	-	-
3574	3	-	-
3663	3	-	-
3719	3	-	-
3741	3	-	-
3792	3	-	-
3799	3	-	-
3875	3	-	-
3920	3	-	-
3979	3	-	-
3992	3	-	-
4375	3	-	-
4569	3	-	-
4662	3	-	-

+: Presencia de crecimiento.

-: Ausencia de crecimiento.

Repetición: Número de veces que se realizó la prueba para esa cepa.

En la tabla XV se muestran los resultados obtenidos para la prueba de rapidez de muerte celular con cloro diluido al 5% y al 10%. Según se puede apreciar ninguna de las 16 cepas evaluadas fue capaz de crecer luego de la exposición durante 5 minutos al desinfectante a esas concentraciones. El 100% de las cepas evaluadas es sensible, por esta razón no se ensayaron concentraciones superiores.

La prueba de suspensión cuantitativa se realizó para las cepas que presentaron resistencia al evaluar mediante la prueba de rapidez de muerte celular. En la tabla XVI se muestra el promedio de 3 repeticiones del cálculo del título bacteriano y del valor del Log10 de la reducción de la viabilidad.

Tabla XVI: Título bacteriano antes y después de la exposición al desinfectante y valores del Log10 de la reducción de la viabilidad en presencia de QAC, producto comercial diluido al 10%.

Cepa	Título antes de la exposición al desinfectante	Título después de la exposición al desinfectante	Log10 de la reducción de la viabilidad
J62-2	1,25x10 ⁹	0	9,09691001
3171	2x10 ⁹	1,53x10 ⁴	5,122572
3574	1,72x10 ⁹	1,40x10 ⁴	5,09024125
3992	1,81x10 ⁹	3x10 ⁴	4,78215399
4569	3,28x10 ⁹	1,46x10 ⁴	5,34998355

Según ha sido reportado los valores del Log10 iguales o mayores a 5 permiten considerar al desinfectante, bajo las condiciones evaluadas, como efectivo contra el microorganismo, mientras si este valor es menor, el desinfectante no se considera efectivo (Anon. 1997).

Los valores obtenidos y mostrados en la tabla XVI para el cálculo de la reducción de la viabilidad de las cepas que presentaron resistencia al ser evaluarlas mediante la prueba de rapidez de muerte celular, permitieron comprobar que solo una (cepa 3992) mostró resistencia al calcular el Log10 de la reducción de la viabilidad (valor menor 5), mientras las otras cepas estudiadas el valor de Log10 fue mayor a 5 (esto incluye el control negativo *E coli* J622). Esto permite sugerir que mediante esta prueba el 75% (3 de las 4 cepas) son sensibles al QAC diluido al 10% y el 25% (1 de las 4 cepas) es resistente.

7.3 Amplificación de los genes que codifican para bombas de eflujo.

A las cepas de *E. coli* que presentaron resistencia al QAC 10% (resultados obtenidos en la prueba de rapidez de muerte celular, tabla XIII, cepas 3171, 3574, 3992 y 4569), se les realizó PCR para amplificar fragmentos de genes que

codifican bombas de eflujo que expulsan compuestos de amonio cuaternario, para esto se realizó la extracción ADN por el método de ebullición.

Con el fin de comprobar que el lisado celular obtenido contiene ADN y que este puede ser amplificado mediante PCR, se realizó una reacción utilizando unos iniciadores que permiten amplificar una región conservada del gen que codifica el ARN ribosomal 16S en diferentes especies bacterianas.

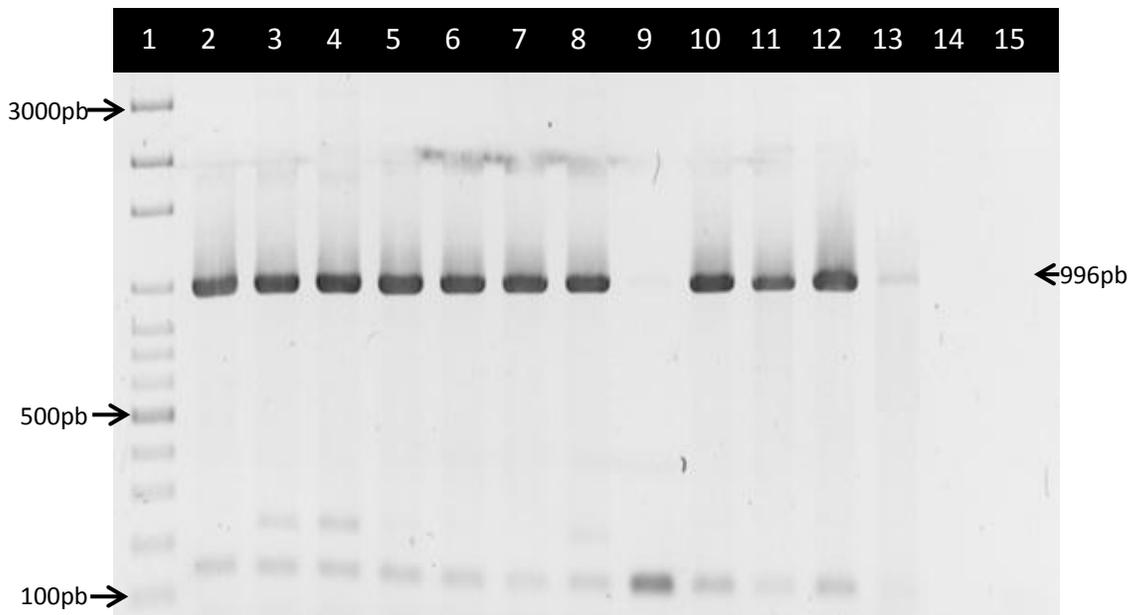


Figura 11: Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR del gen que codifica una región conservada de ARN ribosomal 16S. Carril 1: MPM 100pb. Carril 2: *E. coli* J62-2. Carril 3: *E. coli* 3171. Carril 4: *E. coli* 3574. Carril 5: *E. coli* 3663. Carril 6: *E. coli* 3719. Carril 7: *E. coli* 3992. Carril 8: *E. coli* 4569. Carril 9: *A. baumannii* AB8. Carril 10: *A. baumannii* AB9. Carril 11: *A. baumannii* AB15. Carril 12: *A. baumannii* AU21. Carril 13: *S. maltophilia* SU6. Carril 14: vacío. Carril 15: control de reactivos.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos de la PCR utilizando iniciadores del gen que codifica el ARN ribosomal 16S. En los productos mostrados en los carriles del 3 al 13 se observa la banda que corresponde al amplicon de PCR de aproximadamente 996pb, en el carril 2 se muestra el producto obtenido con el ADN purificado del control positivo, el cual corresponde a

la banda que esperaba observarse. También se observa una banda de aproximadamente 150pb en todas las muestras, la cual ha sido previamente reportada por Jang y colaboradores en el año 2000, como una banda inespecífica que aparece en estas amplificaciones. El control de reactivos (carril 15) demuestra que ninguno de los reactivos estaba contaminado ya que no se observan bandas (no contiene ADN que amplificar).

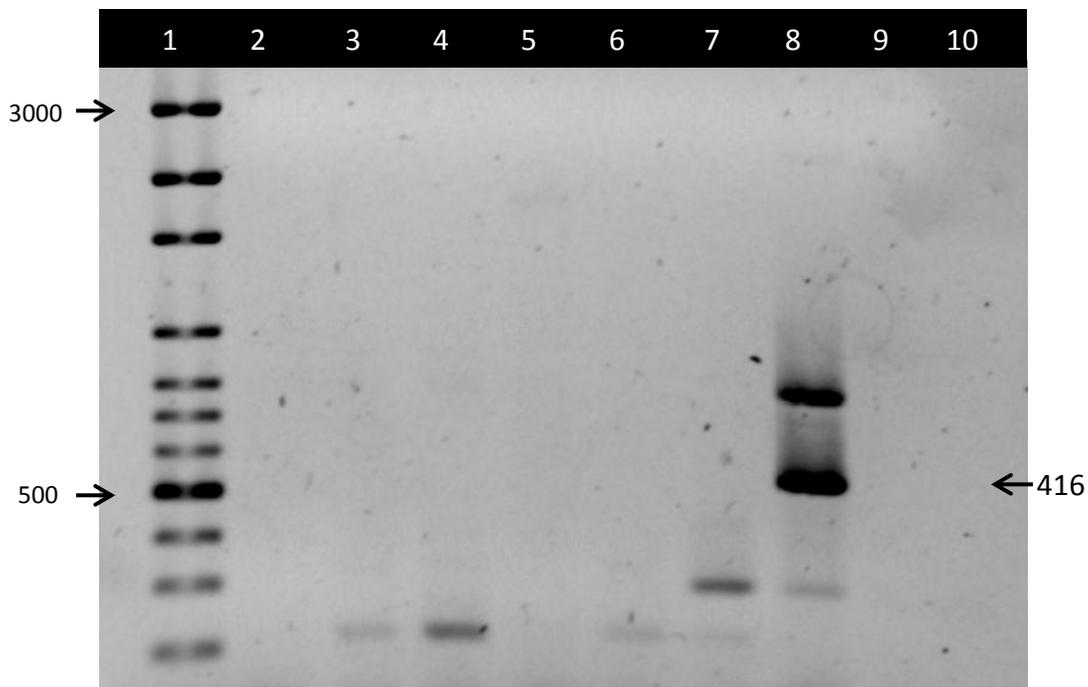


Figura 12: Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR del gen *qacB*. Carril 1:MPM 100pb. Carril 2: *E. coli* J62-2. Carril 3: *E. coli* 3171. Carril 4: *E. coli* 3574. Carril 5: *E. coli* 3992. Carril 6: *E. coli* 4569 Carril 7: *E. coli* 3663. Carril 8: *A. baumannii* AB9 (control positivo). Carril 9: control de reactivos. Carril10: vacío.

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos al amplificar un fragmento del gen *qacB*. Para las muestras correspondientes a las cepas de *E. coli* con fenotipo resistente al QAC diluido al 10% (carriles del 3 al 6), bajo las condiciones ensayadas, no se logró obtener una amplificación positiva de la banda correspondiente a dicho gen. En el carril 2 se muestra el resultado de la reacción de amplificación utilizando como templado el ADN del control negativo de

especificidad (*E. coli* J62-2). En el carril 7 se muestran los resultados obtenidos cuando el templado es el ADN de una cepa de *E. coli* aislada de infecciones en el tracto urinario cuyo fenotipo resultó ser sensible al QAC diluido hasta 10%, en este caso tampoco se observa la banda del amplicon esperado. El control positivo al cual se le evaluó previamente la presencia del gen *qcaB*, se encuentra en el carril 8 y se observa la banda correspondiente al producto de PCR esperado, de aproximadamente 416 pb. El control de reactivos (carril 9) demuestra que ninguno de los reactivos estaba contaminado ya que no se observan bandas (no contiene ADN que amplificar). En los carriles 4 y 7 se observan unas bandas inespecíficas.

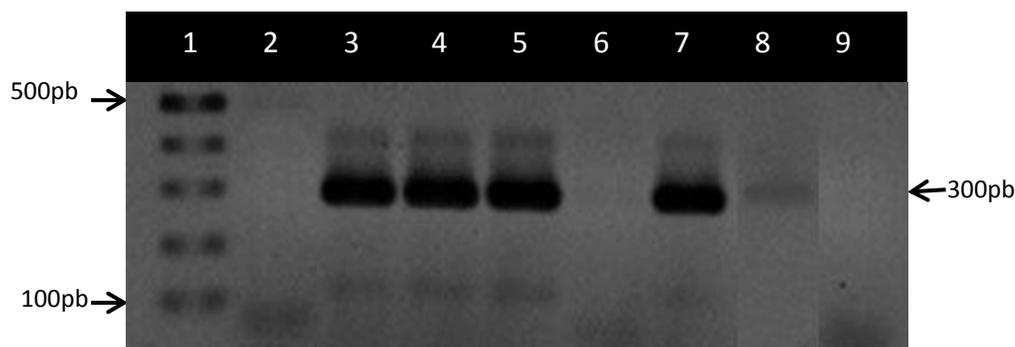


Figura 13: Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR del gen *qacEΔ1*. Carril 1:MPM 100pb. Carril 2: *E. coli* J62-2. Carril 3: *E. coli* 3171. Carril 4: *E. coli* 3574. Carril 5: *E. coli* 3992. Carril 6: *E. coli* 3663. Carril 7: *E. coli* 4569. Carril 8: *A. baumannii* AB9 (control positivo). Carril 9: control de reactivos.

Los resultados obtenidos al amplificar un fragmento del gen *qacEΔ1* se muestran en la figura 13. Utilizando como templado el ADN de las muestras correspondientes a las cepas de *E. coli* con fenotipo resistente resistente al QAC diluido al 10% (carriles 3, 4, 5 y 7) bajo las condiciones ensayadas, se logró obtener una amplificación positiva de la banda esperada de aproximadamente 300 pb. En el carril 2 se muestra el resultado de la reacción de amplificación obtenida utilizando como templado el ADN del control negativo de especificidad (*E. coli* J62-

2). En el carril 6 se muestran los resultados obtenidos cuando el templado es el ADN de una cepa de *E. coli* aislada de infecciones en el tracto urinario cuyo fenotipo resultó ser sensible, en este caso tampoco se observa la banda del amplicon esperado. El control de especificidad positivo, al cual se le evaluó previamente la presencia del gen *qacEΔ1*, se encuentra en el carril 8 y se observa la banda correspondiente al producto de PCR esperado de aproximadamente 300 pb. El control de reactivos (carril 9) demuestra que ninguno de los reactivos estaba contaminado ya que no se observan bandas.

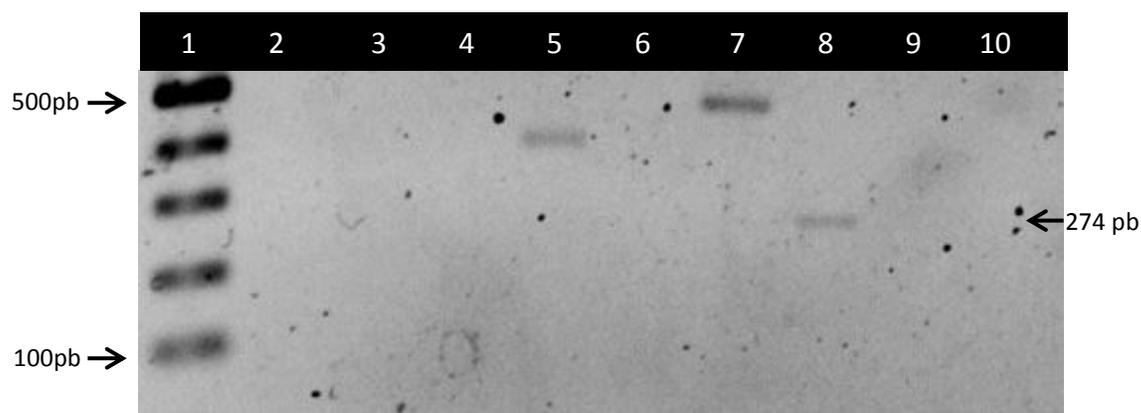


Figura 14: Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR del gen *qacG*. Carril 1:MPM 100pb. Carril 2: *E. coli* J62-2. Carril 3: *E. coli* 3171. Carril 4: *E. coli* 3574. Carril 5: *E. coli* 3992. Carril 6: *E. coli* 4569 Carril 7: *E. coli* 3663 Carril 8: *A. baumannii* AU21 (control positivo). Carril 9: vacío. Carril 10: control de reactivos

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos al amplificar un fragmento del gen *qacG*. Para las muestras correspondientes a las cepas de *E. coli* con fenotipo resistente al QAC diluido al 10% (carriles del 3 al 6) no se logró obtener una amplificación positiva de la banda correspondiente a dicho gen bajo las condiciones ensayadas. En el carril 2 se muestra el resultado de la reacción de amplificación obtenido utilizando como templado el ADN del control negativo de especificidad (*E. coli* J62-2). En el carril 7 se muestran los resultados obtenidos cuando el templado es el ADN de una cepa de *E. coli* aislada de infecciones en el

tracto urinario cuyo fenotipo resultó ser sensible, en este caso tampoco se observa la banda del amplicon esperado. Al control de especificidad positivo se le evaluó previamente la presencia del gen *qacG* este se encuentra en el carril 8 y se observa la banda correspondiente al producto de PCR esperado de aproximadamente 274 pb. El control de reactivos (carril 10) demuestra que ninguno de los reactivos estaba contaminado ya que no se observan bandas.

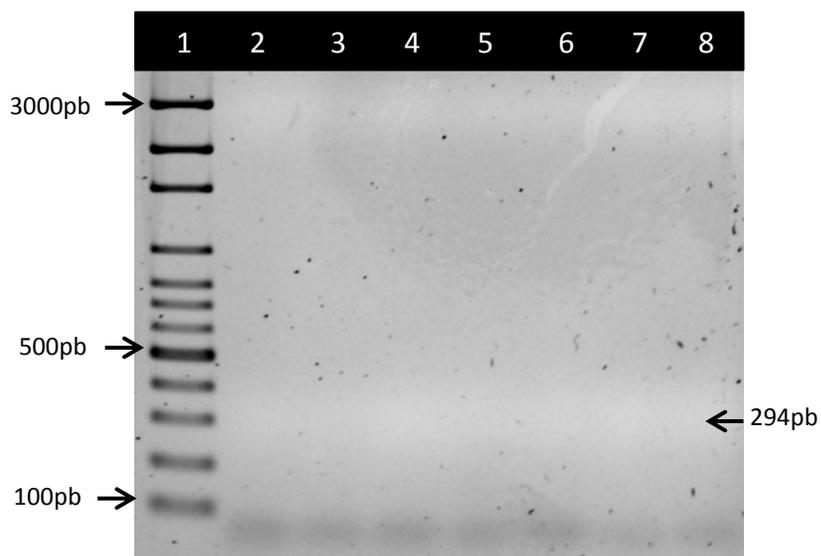


Figura 15: Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR del gen *qacH*. Carril 1:MPM 100pb. Carril 2: *E. coli* J62-2. Carril 3: *E. coli* 3171. Carril 4: *E. coli* 3574. Carril 5: *E. coli* 3992. Carril 6: *E. coli* 4569 Carril 7: *E. coli* 3663. Carril 8: control de reactivos.

Los resultados obtenidos al amplificar un fragmento del gen *qacH*, se muestran en la figura 15. Las muestras correspondientes a las cepas de *E. coli* con fenotipo resistentes se encuentran en los carriles del 3 al 6, mientras en el carril 7 se muestran los resultados obtenidos cuando el templado es el ADN de una cepa de *E. coli* aislada de infecciones en el tracto urinario cuyo fenotipo resultó ser sensible al QAC diluido hasta 10%. En ninguna de las reacciones, bajo

las condiciones ensayadas, se logró obtener una amplificación positiva de la banda correspondiente a dicho gen, la cual es de aproximadamente 294 pb. El carril 2 contiene el control de especificidad negativo (*E. coli* J62-2). El control de reactivos (carril 8) demuestra que ninguno de los reactivos estaba contaminado ya que no se observan bandas. Cabe destacar que para este gen no se tiene control positivo almacenado en el laboratorio.

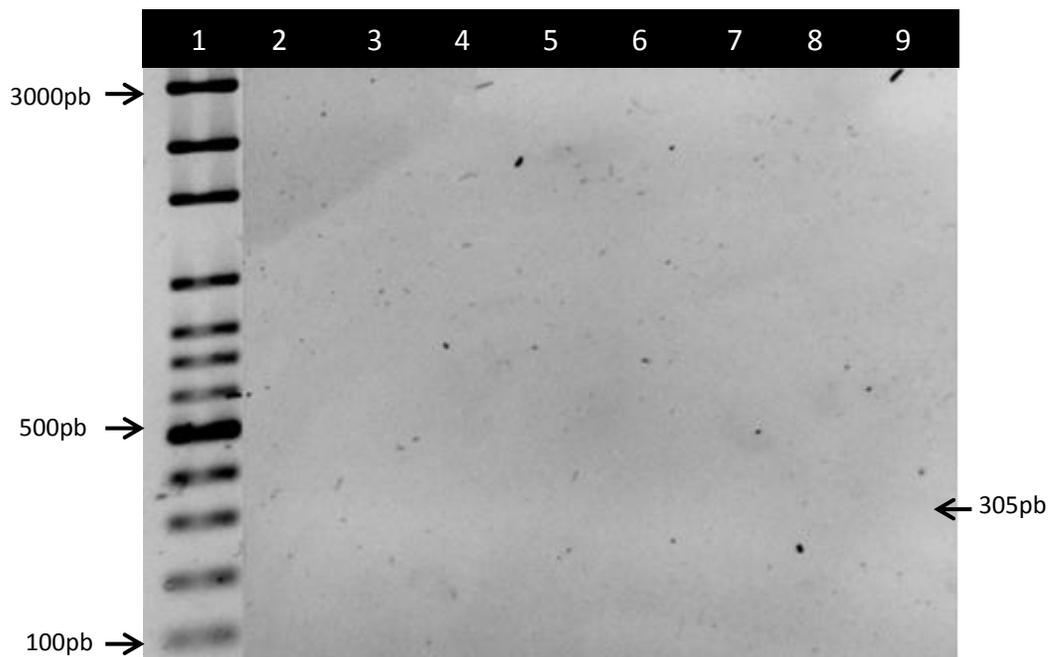


Figura 16: Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR del gen *qacJ*. Carril 1:MPM 100pb. Carril 2: *E. coli* J62-2. Carril 3: *E. coli* 3171. Carril 4: *E. coli* 3574. Carril 5: *E. coli* 3992. Carril 6: *E. coli* 4569 Carril 7: *E. coli* 3663. Carril 8: control de reactivos

En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos al amplificar un fragmento del gen *qacJ*. Las muestras correspondientes a las cepas de *E. coli* con fenotipo resistentes fueron colocadas en los carriles del 3 al 6, mientras en el carril 7 se muestran los resultados obtenidos cuando el templado es el ADN de una cepa de *E. coli* aislada de infecciones en el tracto urinario cuyo fenotipo resultó ser sensible. En ninguna de las reacciones, bajo las condiciones ensayadas, se logró obtener una amplificación positiva de la banda correspondiente a dicho gen la cual

es de aproximadamente 305 pb. El carril 2 contiene el control de especificidad negativo (*E. coli* J62-2). El control de reactivos (carril 8) demuestra que ninguno de los reactivos estaba contaminado ya que no se observan bandas. Cabe destacar que para este gen no se tiene control positivo almacenado en el laboratorio.

Los resultados de evaluar la presencia de genes que codifican bombas de eflujo que confieren resistencia a los QAC, revelan que el gen *qacEΔ1* es el que se encuentra presente en el genoma de las cepas estudiadas.

Tabla XVII: Resultados obtenidos al estudiar el fenotipo de resistencia a los desinfectantes evaluados y la presencia o ausencia de los genes que codifican bombas de eflujo de resistencia a los QAC.

Cepas	Desinfectantes				Genes ensayados de resistencia a QAC				
	QAC		Cloro		<i>qacB</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>qacG</i>	<i>qacH</i>	<i>qacJ</i>
	10%	100%	5%	10%					
J62-2	-	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3171	+	-	-	-	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
3280	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
3438	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
3574	+	-	-	-	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
3663	-	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3719	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
3741	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
3792	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
3799	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
3875	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
3920	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
3979	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
3992	+	-	-	-	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
4375	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
4569	+	-	-	-	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
4662	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND

+: Presencia de crecimiento.

-: Ausencia de crecimiento.

ND: No se evaluó la presencia del gen.

En la tabla XVII se presentan todos los resultados obtenidos al evaluar el fenotipo de resistencia de las 16 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones en el tracto urinario. El 25% de los aislado bacterianos estudiados

mostró resistencia al desinfectante cuyo compuesto activo es un cuaternario de amonio, pero cuando el producto comercial se encontraba diluido hasta el 10%, mientras que el 100% de las cepas evaluadas fue sensible al mismo compuesto pero usando el producto comercial sin diluir. Al evaluar el cloro comercial, cuyo compuesto activo es el hipoclorito de sodio, se encontró que el 100% de las cepas evaluadas es sensible a la acción del desinfectante cuando se encuentra diluido al 5% y 10%. Al realizar los ensayos de PCR para las cepas que expresaron fenotípicamente alguna resistencia, se encontró que de los genes evaluados, sólo se detectó la presencia del gen *qacEΔ1*, en las 4 cepas que crecieron luego de la exposición al desinfectante, es decir que el 25% de las cepas evaluadas en este trabajo contienen el gen.

8. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana a múltiples antimicrobianos representa un severo problema de salud a nivel mundial. Por esta razón, en los últimos años muchos trabajos de investigación se han enfocado en el estudio de bacterias resistentes a los biocidas. Entre estos compuestos los antibióticos han sido sumamente estudiados debido a la importancia de su acción en el área de la salud. Otros antimicrobianos de gran importancia son los antisépticos y desinfectantes, los cuales se usan ampliamente en hospitales, centros de salud y laboratorios en los procesos de control y desinfección. Debido a su uso indiscriminado, las bacterias resistentes a este tipo de compuestos han sido seleccionadas y diseminadas, y son cada vez más comunes (Cabrera y col., 2007).

La reducción de la eficiencia de los desinfectantes es un reto emergente para la higiene clínica y para la industria alimentaria. Representa un grave problema en áreas como la contaminación de alimentos y la adquisición de infecciones nosocomiales, sin embargo los estudios realizados sobre resistencia bacteriana a desinfectantes en su mayoría se realizan en cepas de origen clínico. La resistencia bacteriana a los antimicrobianos ha sido menos estudiada en bacterias aisladas de la comunidad, pero estudiar estos microorganismos es necesario para evaluar que tan distribuidos están los genes de resistencia a los desinfectantes en las personas de la comunidad que habitualmente no están expuestas a grandes dosis de antimicrobianos.

Las cepas evaluadas en el presente trabajo fueron aisladas de pacientes que acudieron a consulta ambulatoria con una infección en el tracto urinario es decir,

que no se encontraban hospitalizados. Estas cepas tiene un análisis previo de resistencia a los antibióticos (tabla VI) presentando múltiple resistencia (Angiolillo, 2007).

Con el fin de comparar la resistencia de estas cepas, provenientes de pacientes de la comunidad, a productos desinfectantes se emplearon dos antimicrobianos: un compuesto de amonio cuaternario, el cual es uno de los desinfectantes mayormente usado en los recintos de salud, y el cloro comercial, cuyo mayor uso es en el área doméstica.

En el estudio se evaluaron cepas de *Escherichia coli*, una bacteria Gram negativa, presente en la flora intestinal de los humanos. Se ha demostrado que las células Gram negativas son generalmente menos susceptibles a los biocidas que las células Gram positivas, esto debido a que la envoltura celular de los microorganismos Gram negativos constituye una barrera de permeabilidad dificultando el acceso a las moléculas tóxicas al interior de las células (Russell y col., 2004). Los estudios realizados pertinentemente demuestran que las bacterias Gram negativas, constituyen las cepas bacterianas con mayor resistencia (Rodríguez y col., 2006).

El estudio de la resistencia en *E. coli*, como bacteria propia de la flora intestinal, es importante debido a que podrían estar actuando como reservorio de los genes de resistencia antimicrobiana distribuidos en la comunidad, siendo un reflejo de la exposición comunitaria a estos agentes (Mosquito y col., 2011).

Así, el estudio de la resistencia a los desinfectantes en los aislados bacterianos de pacientes de la comunidad y conocer la causa de este fenotipo de resistencia, resulta de gran importancia, porque permite considerar posibles medidas para evitar la infección con bacterias resistentes. En este trabajo se evaluó la resistencia de cepas de *E. coli* a desinfectantes usados tanto en los centros de salud como en el área doméstica y la presencia de bombas de eflujo como posibles causantes del fenotipo de resistencia.

8.1 Resistencia a los desinfectantes evaluados.

La resistencia a los desinfectantes se evaluó mediante 2 pruebas recomendadas por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC). Se utilizaron estos criterios debido a que en Venezuela no se tienen establecidas pruebas para determinar la resistencia a los desinfectantes. Previo a estas pruebas, se realizaron dos controles del neutralizante: El control de toxicidad del neutralizante se realizó para evaluar que el neutralizante no es tóxico para las cepas evaluadas, y los resultados demostraron que todas las cepas (incluyendo el control, *E. coli* J622) fueron capaces de crecer en el neutralizante usado (tabla XI), demostrando de este modo que el caldo Lethen Modificado no es tóxico para ninguna de las cepas evaluadas en las pruebas de susceptibilidad y descartando de esta manera que la ausencia de crecimiento sea causada por el neutralizante. Además se realizó un control de neutralización, corroborándose que el neutralizante usado fue capaz de inhibir la acción del desinfectante a la concentración estudiada (tabla XII) en un tiempo de 5 minutos, permitiendo su uso

para realizar las pruebas en un tiempo definido. Estos controles permiten realizar las pruebas de rapidez de muerte celular y suspensión cuantitativa.

Para evaluar la resistencia de las cepas al cloro comercial se empleó como ensayo inicial la prueba de rapidez de muerte celular con distintas concentraciones del producto. Los resultados con las 16 cepas estudiadas (tabla XV), demostraron que ninguna logró crecimiento luego de la exposición al desinfectante durante 5 minutos. Se evaluaron diferentes concentraciones, diluyendo el producto comercial hasta el 5% y hasta el 10%. Al no encontrar cepas resistentes no se probaron concentraciones superiores, ni se realizó la prueba de suspensión cuantitativa. Estas diluciones del producto comercial hasta 5% y 10% están cerca de la recomendación del etiquetado para su uso. Los resultados demostraron que no hubo crecimiento de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes de la comunidad.

Existen reportes previos de estudios sobre la resistencia a cloro en cepas aisladas de distintos ambientes, entre estos aguas cloradas, y se reportó que la mayoría de las cepas tenían resistencia a cloro, atribuyéndose a la presión selectiva ejercida por la exposición continua al producto (Hiraishi y col., 1995). Otro estudio de la resistencia bacteriana a hipoclorito de sodio con microorganismos de colección en laboratorios, que no están expuestos a presión selectiva constante, reportó que el efecto microbicida del hipoclorito de sodio al 2%, fue total en bacterias en estado vegetativo (Estrela y col., 2003). También se realizaron trabajos para evaluar la efectividad del hipoclorito de sodio en bacterias creciendo en forma de biopelículas (Sena y col., 2006), reportando que este antimicrobiano es efectivo cuando se encuentra en 5,25% el compuesto activo y

con agitación mecánica, contra bacterias de las especies: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Estos reportes previos son concordantes con los resultados obtenidos, según los cuales, bajo las condiciones evaluadas, ningunas de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes ambulatorios con infecciones en el tracto urinario, es resistente al cloro comercial diluido en 5% y 10%. A pesar que este agente antimicrobiano es uno de los más usados en el área doméstica, debido a su economía y fácil adquisición, las cepas aisladas de personas que adquirieron las infecciones urinarias en la comunidad no presentan resistencia. Estos resultados son altamente satisfactorios y permiten sugerir la continuidad del uso de este agente antimicrobiano ya que conserva un amplio espectro de actividad bactericida.

Los compuestos de amonio cuaternario son los agentes desinfectantes más usados para la limpieza en los centros de salud. En este trabajo se evaluó su efectividad frente a las cepas de *E. coli* provenientes de pacientes de la comunidad, mediante las pruebas de rapidez de muerte celular y la suspensión cuantitativa (tablas XIII y XIV).

Los resultados de la prueba de rapidez de muerte celular demostraron que 4 (25%) de las 16 cepas evaluadas mostraban crecimiento luego de la exposición al desinfectante cuando la concentración de este fue de 10%, y el resto permaneció sensible. A estas 4 cepas se les realizó la prueba de suspensión cuantitativa, para

cuantificar la reducción de la viabilidad de estas bacterias. En los parámetros para esta prueba está establecido que con un valor de reducción de la viabilidad menor a 5 se considera que el desinfectante no es efectivo, mientras si es igual o mayor que 5 el desinfectante si se considera efectivo.

Los resultados de la prueba de suspensión cuantitativa demostraron que de las 4 cepas de *E. coli* evaluadas, solo 1 de estas es resistente, las otras tres cepas resultaron ser sensibles a la acción del antimicrobiano. En el caso de las cepas sensibles (3171, 3574 y 4569) se obtuvo un título alrededor de 10^4 luego de la exposición al desinfectante (tabla XVI), es decir, se encontraron bacterias capaces de crecer luego de la exposición al producto, solo que este título no fue lo suficientemente alto como para que al calcular el valor de reducción de la viabilidad se obtuvieran valores menores a 5, sin embargo estuvo muy cercano a 5 variando entre 5,09 el menor a 5,34 el valor mayor. Según lo establecido por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) de las 4 cepas evaluadas, una cepa obtuvo un valor menor a 5 (ver tabla XVI) reportándose como resistente, para las otras 3 cepas el valor fue igual o mayor a 5 reportándose como sensibles, siendo el desinfectante efectivo contra las cepas 3171, 3574 y 4569.

Al comparar los resultados obtenidos en ambas pruebas de rapidez de muerte celular y suspensión cuantitativa con QAC diluido hasta 10%, encontramos que en la primera prueba, 4 de las 16 cepas estudiadas son resistentes, mientras que en la suspensión cuantitativa 1 de las 4 cepas evaluadas es resistente. Esto puede explicarse debido a que el título obtenido luego de la exposición al desinfectante al realizar la prueba de suspensión, a las 24 horas de incubación, en el medio líquido

se registra con turbidez visible, por esto al evaluar mediante la prueba de rapidez de muerte celular estas cepas, se observó crecimiento luego de la exposición al desinfectante.

Las células que sobreviven a la acción del QAC, en este caso el producto comercial diluido al 10%, se puede sugerir que son células persistentes. El fenotipo de persistencia es un rasgo epigenético exhibido por una subpoblación de bacterias, que se caracteriza por un crecimiento lento junto con una capacidad para sobrevivir a la exposición a un antimicrobiano. Estas células bacterianas adquieren el fenotipo de persistencia a través de un cambio espontáneo y reversible de las células pudiendo, las poblaciones de células bacterianas clonales pasar a células persistentes, cuya tasa de división es lenta, lo que conduce a la adaptabilidad de esa mínima parte de la población a la acción de los antimicrobianos. Las células persistentes suprimen significativamente el crecimiento, pudiendo salvar de la extinción a la población en momentos de estrés (Kussell y col., 2005). La tasa óptima de cambio entre células normales y persistentes depende fuertemente de la frecuencia de los cambios ambientales y sólo débilmente de las presiones selectivas de cualquier ambiente dado, por lo cual la persistencia parece constituir una adaptación que se sintoniza a la distribución de los cambios ambientales (Kussell y col., 2005).

Las células que sobreviven a la acción del desinfectante, pertenecen a esa población de células persistentes, que representan una pequeña fracción de la población. La insensibilidad exhibida por las células persistentes no es hereditaria. Se ha reportado que cultivos que han crecido a partir células persistentes son tan

sensibles a los antimicrobianos como el cultivo del que se derivaron las células persistentes (Moyed y Broderick, 1986). Por lo cual se infiere que las células persistentes no se quedan en este fenotipo indefinidamente, sino que espontáneamente cambian al estado normal y recuperan su sensibilidad habitual. Se ha descrito en micobacterias la presencia células que sobreviven a la acción del desinfectante cuyo compuesto activo es un QAC, pero estas células sobrevivientes no son resistentes, ya que este fenotipo frente al antimicrobiano es reversible (Cortesia y col, 2010).

La posibilidad que el desinfectante empleado no elimine a todas las bacterias presentes es de gran importancia en los centros de salud, ya que estas bacterias que sobreviven a la acción de los antimicrobianos, aunque no posean genes de resistencia, son capaces de replicarse, causando la contaminación de las áreas hospitalarias e incluso incrementar la aparición de infecciones nosocomiales. Esta situación también puede aplicarse en el área doméstica e industrial.

Existen múltiples estudios a nivel nacional e internacional sobre la resistencia a compuestos de amonio cuaternarios (QAC), que han sugerido que esta resistencia esta ampliamente expandida (Rutala y col., 1997), (Langsrud y col., 2003), (Buffet-Bataillon y col., 2011), (López y col., 2010), (Guimarães y col., 2000), (Bello y col., 2005), (Bello y col., 2008), (Cortesia y col., 2010), (Ramos y Alonso, 2011).

Los valores obtenidos de reducción de la viabilidad (tabla XVI) permiten sugerir que entre las cepas evaluadas se encuentra solo una resistente al QAC,

tres con un comportamiento similar a la resistencia y 12 sensibles. Sin embargo, no se puede excluir que solo se esté en presencia del fenómeno de persistencia. Para saber si trata de una población resistente o una persistente, se debe realizar pruebas a futuro, tomando parte de las colonias que crecen en presencia del agente, y volver a realizar completa la prueba fenotípica y determinar el % de crecimiento, para calcular si hay crecimiento del 100% de la población o solo de una fracción. Con esto se podrá determinar si la resistencia exhibida por esta fracción de la población es reversible, si sobrevive un porcentaje de la población al realizar de nuevo el experimento, o si el crecimiento es del 100% de la población y entonces la cepa es considerada resistente.

Los resultados de las pruebas fenotípicas ante ambos desinfectantes parecen indicar que las cepas estudiadas no provienen de ambientes seleccionados con una presión selectiva alta, ya que se mantienen sensibles a ambos agentes. Los compuestos de amonio cuaternario son de mayor uso en los centros de salud, las cepas evaluadas al provenir de aislados de pacientes de la comunidad, no se encuentran expuestas a este agente, y probablemente no han sido sometidas a esta presión selectiva que permita seleccionar bacterias resistentes. El cloro comercial, a pesar de ser el producto desinfectante de mayor uso en el área doméstica, mantiene una efectividad considerable frente a estas cepas bacterianas, lo que permite sugerir que los genes de resistencia para este compuesto no se encuentran ampliamente extendidos.

8.2 Evaluación de genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario mediante PCR

La resistencia adquirida a los desinfectantes y a cualquier agente antimicrobiano puede surgir por mutación o por la adquisición horizontal de material genético en forma de plásmidos o transposones. Estas configuraciones permiten que ocurran arreglos grandes de genes de resistencia para la mayoría de los antibióticos y los desinfectantes, y pueden ser transferidos juntos en un solo evento (Cabrera y col., 2007). Muchos estudios han demostrado que la resistencia mediada por plásmidos también pueden incluir fármacos múltiples. Por estas razones, ha aumentado la preocupación que la resistencia a los antibióticos también podría exhibir una resistencia cruzada con desinfectantes (Rutala y col., 1997).

La resistencia a los compuestos de amonio cuaternario se ha reportado que puede ser causada por la presencia de bombas de eflujo (Hegstad y col. 2010). Los genes que codifican las bombas de flujo pueden encontrarse en el cromosoma o en elementos transmisibles tales como los plásmidos. Estas bombas de eflujo, al expulsar los compuestos tóxicos fuera de la célula, disminuyen la concentración intracelular del antimicrobiano, permitiendo así la supervivencia de las células bacterianas (Piddock, 2006).

Algunas bombas de eflujo se han reportado como responsables de la resistencia a los QAC, entre las cuales se encuentran las proteínas QACa, QACb, QACc, QACd, QACe, QACe Δ 1, QACf, QACg, QAC Δ h y QAC Δ h, que están

codificadas por los genes *qacA*, *qacB*, *qacC*, *qacD*, *qacE*, *qacEΔ1*, *qacF*, *qacG*, *qacH* y *qacJ* respectivamente.

Estos genes pueden estar codificados en el genoma o en plásmidos, o en otro tipo de elementos genéticos como los integrones, como es el caso del gen *qacEΔ1*, el cual es descrito como una versión mutante del gen *qacE*. La proteína QACeΔ1, parece ser parcialmente funcional para exportar múltiples fármacos. Los cambios entre QACe y QACeΔ1 que permiten diferenciar ambas moléculas, se producen en el cuarto segmento transmembrana y la cola C-terminal de estas proteínas (Paulsen y col., 1993). Este gen se encuentra distribuido ampliamente en bacterias Gram-negativas debido a su ubicación en la región 3' conservada de los integrones clase 1 (Chuanchuen y col., 2007).

En este trabajo en aquellas cepas de *E. coli* que presentaban resistencia a QAC, se evaluó la presencia de los genes *qacB*, *qacEΔ1*, *qacG*, *qacH* y *qacJ* mediante amplificación por PCR de fragmentos de dichos genes, para sugerir experimentos futuros y relacionar la presencia de estos genes con la resistencia al desinfectante.

En la figura 12 se muestra el resultado obtenido al amplificar el gen *qacB*. En ninguna de las cepas evaluadas se amplificó dicho gen, mientras que en el control positivo si se observa la banda del tamaño esperado. Estos resultados demuestran que las cepas que presentan resistencia a QAC no poseen la proteína QACb y entonces la resistencia no podría relacionarse con esta bomba.

Las reacciones de PCR de los genes *qacG*, *qacH* y *qacJ* no amplificaron en las cepas de *E. coli* evaluadas, sugiriendo que las proteínas de eflujo codificadas por estos genes no están presentes en estas bacterias y no son las causantes de la resistencia al desinfectante. Estos genes fueron reportados por Ye y colaboradores en el año 2011 como poco frecuentes en aislados clínicos humanos, mientras que han sido descritos con mayormente en los aislamientos de estafilococos de la industria alimentaria (*qacG* y *qacH*) y animales domesticados (*qacJ*).

Al evaluar la presencia del gen *qacEΔ1* (figura 13) los resultados demostraron que en todas las cepas que presentan la resistencia a QAC así como en el control positivo, se amplificó el gen. Este gen se encuentra presente en el extremo 3' conservado de los integrones de clase 1 (figura 17).

En la estructura básica del integrón se encuentra el gen *intl* que codifica una proteína con actividad de recombinasa sitio específico, la integrasa. Adyacente a *intl* se encuentra el sitio de recombinación específica, *attI*, en el que se integra el *cassette* genético de resistencia. Entre *intl* y *attI* se encuentran dos promotores divergentes, PI para la expresión de *intl* y PC, para la expresión de los *cassettes* genéticos insertos río abajo. La enzima IntI permite la interacción entre *attI* y el sitio *attC* de los *cassettes* genéticos, uniendo ambos sitios y facilitando la integración o escisión del *cassette* de resistencia en la región variable del integrón donde se insertan los diferentes casetes génicos (González y col., 2004). Existen dos tipos de integrones: el grupo I o también llamado “integrones móviles” relacionados con los casetes de resistencia y el grupo II o “superintegrones”, que a

diferencia de los primeros, están a nivel cromosómico. El grupo I, a su vez se divide en 3 clases de integrones: integrones de clase 1, clase 2 y clase 3, siendo los de clase 1, los integrones más frecuentemente descritos. En la mayoría de los integrones clase 1 descritos, existe un extremo 3' altamente conservado que contiene los genes *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* que codifican resistencia, respectivamente, a compuestos de amonio cuaternario, a bromuro de etidio, a sulfonamidas y a una proteína con función desconocida (Fluit y Schmitz, 2004).

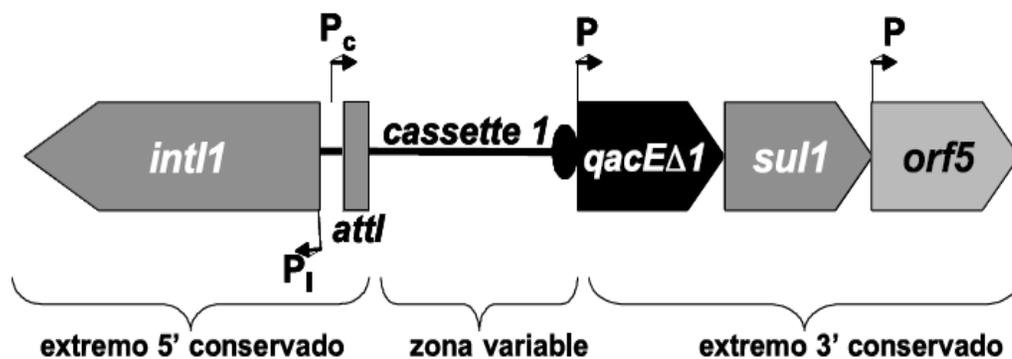


Figura 17: Representación esquemática de la estructura básica de un integrón con la adquisición de un *cassettes* genético de resistencia. *intl1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los *cassettes* son integrados; P_I : promotor que transcribe la integrasa; P_C : promotor que dirige la transcripción de los *cassettes* integrados. *qacEΔ1*: gen que codifican resistencia a compuestos de amonio cuaternario, a bromuro de etidio, *sul1*: gen que codifican resistencia a sulfonamidas y *orf5*: gen que codifica una proteína de función desconocida (tomado y modificado de González y col., 2004 consultado 20/12/12).

Los integrones de clase 1 son frecuentemente encontrados en bacterias Gram negativas, estando presente ampliamente en los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Sabaté y Prats, 2002).

Se han realizados estudios que demuestran que el gen *qacEΔ1* esta ampliamente distribuido (Wang y col., 2008) (Romão y col., 2011). Los reportes previos, junto con los resultados de este trabajo, nos permiten sugerir que la bomba de eflujo codificada por el gen *qacEΔ1* sea la responsable de la resistencia

exhibida por estas células ante el agente desinfectante ensayado, sin embargo se requieren otros estudios para comprobar esta idea.

El gen *qacEΔ1* usualmente está presente en los integrones de clase 1, al igual el gen que codifica la resistencia a sulfonamidas, pero la cepa 3663 que es resistente a SXT pero sensible al desinfectante, no posee el gen *qacEΔ1*, por lo cual no se puede corroborar si el gen está presente en un integrón de clase 1.

Los resultados obtenidos en este trabajo tanto en las pruebas fenotípica como en la determinación de genes que codifican bombas de eflujo (tabla XVII), permiten sugerir que las cepas aisladas de infecciones en el tracto urinario de pacientes de la comunidad, en general, se mantienen sensibles a los 2 desinfectantes evaluados. Solo 1 de 16 cepas evaluadas mostró resistencia ante el QAC diluido al 10%, mientras que frente a este mismo antimicrobiano, 3 de las 16 cepas mostraron un comportamiento similar a la resistencia, y para el QAC sin diluir y para el cloro comercial ninguna de las 16 cepas mostró resistencia. Al evaluar las bombas de eflujo que expulsan QAC, se encontró que en las 4 cepas en las que se observó crecimiento luego de la exposición al antimicrobiano está presente el gen *qacEΔ1*, el cual generalmente se encuentra en los integrones de clase 1.

La evaluación del fenotipo de resistencia de esta cepas provenientes de pacientes de la comunidad permitió evaluar cuán dispersos están los genes de resistencia a desinfectantes en individuos de la comunidad y comparar esta

resistencia entre ambos desinfectantes evaluados, en relación al área donde son más utilizados.

Los resultados previos obtenidos por Angiolillo en el 2007, mostraron que estas cepas poseían resistencia a múltiples antibióticos, pero al evaluar el fenotipo de resistencia a los desinfectantes, encontramos que la resistencia a este tipo de antimicrobianos no se encuentran tan extendida, sugiriendo que no se tiene una resistencia cruzada entre antibióticos y desinfectantes, siendo concordante con los trabajos realizados anteriormente.

El presente trabajo es el primer estudio en el país, que evalúa el fenotipo de resistencia de cepas provenientes de pacientes de la comunidad a los desinfectantes. Los resultados aquí obtenidos, servirán de base para próximas investigación acerca de la resistencia a desinfectantes en cepas provenientes de la comunidad y los posibles determinantes que causan de dicha resistencia.

9. CONCLUSIONES

- De las 16 cepas aisladas de pacientes ambulatorios con infecciones en el tracto urinario, 1 cepa (6,25%) presentó fenotipo de resistencia, 3 cepas (18,75%) mostraron un comportamiento similar a la resistencia y 12 (75%) fueron sensibles, al evaluar el desinfectante cuyo producto activo es un compuesto de amonio cuaternario encontrándose diluido al 10%. Para este mismo producto sin diluir, el 100% de las cepas es sensible.

- De las 16 cepas estudiadas, el 100% fue sensible al evaluar el fenotipo de resistencia ante el cloro comercial diluido al 5% y 10%.

- Al evaluar mediante PCR la presencia de genes que codifican para bombas de eflujo, solo se amplificó en el 25% de las cepas un fragmento del gen *qacEΔ1*. Los genes *qacB*, *qacG*, *qacH* y *qacJ* no se encuentran presentes en las cepas evaluadas.

- Las 4 cepas que mostraron crecimiento luego de la exposición al QAC al 10% poseen el gen *qacEΔ1*.

10. RECOMENDACIONES

La desinfección es de gran importancia para evitar la contaminación con microorganismos, tanto en centros de salud como en el área doméstica. Para evitar la proliferación de microorganismos en áreas no deseadas, es necesario el uso correcto de los productos antimicrobianos. Para llevar a cabo esta tarea es necesario tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Usar el desinfectante correctamente, como esta descrito en el etiquetado del producto. Dejarlo actuar el tiempo y a la concentración recomendada. El uso inadecuado y a concentraciones subinhibitorias, traería consecuencias no deseadas como la selección de microorganismos resistentes al biocida empleado.
- Es importante escoger el desinfectante adecuado. Esto dependerá de las condiciones de la desinfección, teniendo en cuenta el espectro antimicrobiano del producto, la cantidad de microorganismos, la temperatura de la reacción, el pH del medio y la presencia de materia orgánica, ya que son factores que modifican la acción de los desinfectantes.
- Es recomendable usar la rotación de distintos tipos de desinfectantes, con diferentes sitios blancos. Evitando así la selección de microorganismos resistentes al usar un antimicrobiano en específico.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, H., Plascencia, A., Rivera, C., Guerrero, M., Murillo, V. 2007. Resistencia de *Escherichia coli* en infecciones de vías urinarias en pacientes pediátricos del Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde". *Enferm. Infec. Micr. Cl.* **27(3)**: 83-87.
2. Angiolillo, G. 2007. Caracterización de los plásmidos presentes en cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas con resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
3. Anon. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements (Phase 2, Step 1) London: British Standards Institution 1997.
4. Bello-Gonzalez, T., Rivera-Olivero, I., de Waard J. 2005. Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas. *Enferm. Infec. Micr. Cl.* **24 (5)**: 319-321.
5. Bello-Gonzalez, T., Rosales-Pantoja, P., Acosta-Gio, A., de Waard, J. 2008. Instrument processing with lauryl dimethyl benzyl ammonium bromide: A challenge for patient safety. *Am. J. Infect. Control.* **36**: 598-601.
6. Bischoff, M., Bauer, J., Preikschat, P., Schwaiger, K., Mölle, G., Hölzel, C. 2001. First detection of the antiseptic resistance gene qacA/B in *Enterococcus faecalis*. *Microb. Drug Resist.* **00**: 1-6.
7. Bjorland, J., Steinum, T., Kvitle, B., Waage, S., Sunde, M., Heir, E. 2005. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among Staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J. Clin. Microbiol.* **43(9)**: 4363-4368.
8. Buffet-Bataillon, S., Branger, B., Cormier, M., Bonnaure-Mallet M., Jolivet-Gougeon A. 2011. Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical *E. coli* isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes. *J. Hosp. Infect.* **79**: 141-146
9. Cabrera, C., Gómez, R., Zúñiga, A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb. Med.* **38 (2)**: 149-158.
10. Chaidez, C., Lopez J., Castro-del Campo, N. 2007. Quaternary ammonium compounds: an alternative disinfection method for fresh produce wash water. *J. Water Health.* **5**: 329 – 333.

11. Chuanchuen, R., Khemtong, S., Pudungtod, P. 2007. Occurrence of *qacE/qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. *Trop. Med. Public Health.* **38**: 855-862.
12. Cortesia, C., Lopez, G., De Waard, J., Takiff, H. 2010. The use of quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. *J Antimicrob Chemother.* **65**: 2574–2581.
13. Estrela C., Ribeiro, R., Estrela, C. R., Pécora, J., Sousa, M. 2003. Antimicrobial Effect of 2% Sodium Hypochlorite and 2% Chlorhexidine Tested by Different Methods. *Braz. Dent. J.* **14(1)**: 58-62.
14. Famiglietti, A., Quinteros, M., Vázquez, M., Marín, M., Nicola, F., Radice, M., Galas, M. y colaboradores. 2005. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Rev. Argent. Microbiol.* **37**: 57-66.
15. Fluit, A., Schmitz, J. 1999. Class 1 integrons, gene cassettes mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **18**: 761-770.
16. Gilbert, P., McBain, A. 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **16(2)**:189-208.
17. Gilbert, P., Moore, L. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 703–715.
18. González, G., Mella, S., Zemelman, R., Bello, H., Domínguez M. 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev Méd Chile*, **132**: 619-626
19. Guariglia, V., Rizzolo, K., Ramos, Y., Alonso, G. 2008. Estudios de los determinantes de resistencia y de las propiedades conjugativas de los plásmidos presentes en aislados bacterianos venezolanos. *Mem. Inst. Biol. Exp.* **5**:101-104.
20. Guimarães, M., Tibana, A., Nunes, M., Netto, K. 2000. Disinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in brazilian hospital bacterial isolates. *Braz. J. Microbiol.* **31**:193-199.
21. Guzmán, M., Alonso, G. 2008. Integrones clase 1 asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **28**:105-109.
22. Hegstad, K., Langsrud, S., Tore, B., Aamdal, A., Sunde, M., Yazdankhah, S. 2010. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and

spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health?. *Microb. Drug Resist.* **16**: 91- 104.

23. Hiraishi, A., Furuhashi, K., Matsumoto, A., Koike, K., Fukuyama, M., Tabuchi, K. 1995. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl. Environ. Microbiol.*: **61(6)**:2099- 2107.

24. Ioannou, C., Hanlon, G., Denyer, S. 2007. Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Ch.* **51**: 296-306

25. Jang, L., Perng C., Lee, S., Wan, C. 2000. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2076–2080.

26. Kawamura-Sato, K., Wachino, J., Kondo, T., Ito, H., Arakawa, Y. 2008 Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**: 568–576.

27. Koneman E., Allen S., Dowell V.R., Sommers H. 1983. Diagnostico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.

28. Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N., Leibler, S. 2005. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics* **169**: 1807–1814

29. Langsrud, S., Sundheim, G., Borgmann-Strahsen, R. 2003. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas spp.* *J. Appl. Microbiol.* **95**: 874–882

30. López, C., Grande, J., Lucas R., Gálvez, A. 2010. Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. *Anales.* **23 (1)**: 121- 136

31. Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., 2002, Biología de los Microorganismos. Pearson Prentice Hall, Decima Edición, México.

32. Marchetti, M., Errecalde, J., Mestorino, N. 2011. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multirresistencia. *Analecta Vet.* **31(2)**: 40-53.

33. Mayer, S., Boosa, M., Beyera, A., Fluit, A., Schmitza, J. 2001. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**: 896–897.

34. McDonnell G., Russell D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12 (1)**: 147–179.

35. Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., Ochoa, T. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp.* **28(4)**:648-656.
36. Moyed, H., Broderick, S. 1986. Molecular cloning and expression of hipA, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J.Bacteriol.* **166**:399-403
37. Nuñez, L., Moreton, J. 2006. Perfil microbiológico y resistencia bacteriana a desinfectantes en aguas residuales de hospital. *Hig. Sanid. Ambient.* **6**: 197-201.
38. Paulsen, I., Littlejohn, T., Radstrom, P., Sundstrom, L., Skold, O., Swedberg, G., Skurray, R. 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Ch.* **37** (4): 761-768
39. Piddock, L. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19(2)**: 382-402.
40. Poole, K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 55-64
41. Prescott L., Harley J., Klein D. 1999. Microbiología. McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U. España.
42. Ramos, Y., Alonso, G. 2011. Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **31**: 130-137.
43. Redondo, C., Angiolillo, G., Fernandes A., Fernandez, S., Alonso, G. 2008. Caracterización fenotípica y molecular de los plásmidos presentes en cepas bacterianas aisladas en ambientes clínicos. *Mem. Inst. Biol. Exp.* **5**:109-112.
44. Restrepo, A., Robledo, J., Leiderman, E., Restrepo, M., Botero, D., Bedoya, V., 2003. Enfermedades infecciosas. Corporación para Investigaciones Biológicas, Sexta edición, Medellín, Colombia.
45. Ridgway, H., Olson B. 1982. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microb.* **44** (4): 972-987.
46. Rivera, A., Chávez, E., Rendón, G., Giono S. 2006. Viabilidad de *Escherichia coli* en presencia de diferentes contaminantes. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública.* **23(2)**: 110-113.
47. Rodríguez-A., G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de Méx.* **44**: 464-475.

48. Rodríguez, A., Martínez, D., Páez, N., Rodríguez, C. 2006. Estudio de la resistencia de microorganismos aislados de infecciones nosocomiales ante soluciones en uso. *Rev. Mex. Patol. Clin.* **53(2)**:119-122.
49. Romão C., Miranda, C., Silva, J., Mandetta, M., Filippis, I., Asensi, M. 2011. Presence of qacED1 gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. *Curr Microbiol.* **63**:16–21
50. Russell, A. 2004. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J. Hosp. Infect.* **57**: 97–104.
51. Rusell, A. D. 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet.* **3**: 794-803.
52. Russell A. D. 2004. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Cuarta edición. Editorial Blackwell Publishing. Australia.
53. Rutala, W., Stiegel, M., Sarabbi, F., Weber, D. 1997. Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectants. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **18**: 417 – 421.
54. Rutala, W., Weber, D. 1997. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin. Microbiol. Rev.* **10(4)**:597-610.
55. Sabaté, M., Prats, G. 2002. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infec Micr Cl.* **20(7)**:341-345.
56. Saby, S., Leroy, P., Block, J. 1999. *Escherichia coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation. *Appl. Environ. Microb.* **65 (12)**: 5600–5603.
57. Sánchez, P. 2003. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Rev. Quimioterap.* **16(2)**: 172-187.
58. Sena, N., Gomes, B., Vianna, M., Berber, V., Zaia, A., Ferraz, C., Souza-Filho, F. 2006. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* **39**: 878–885.
- Sheldon, A. 2005. Antiseptic “Resistance”: Real or Perceived Threat?. *Clin Infect Dis.* **40**: 1650–1656.
59. Silva, L., Pérez, J., Junquera, C., Ania, J., Alés, M., Cara, J., Puertas, E. 2006. Limpieza del instrumental e higiene del medio hospitalario. Primera Edición. Editorial MAD S.L. Sevilla, España.
60. Stickler, D. J., Thomas, B. 1980. Antiseptic and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria causing urinary tract infection. *J. Clin. Pathol.* **33**: 288-296.

61. Wang, C., Zhan, Q., Mi, Z., Huang, Z., Chen, G. 2008. Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEDelta1* in 283 clinical isolates of Gram-negative bacteria in China. *J. Hosp. Infect.* **69**: 394-396.

62. Ye, H-F., Zhang, M., O'Donoghue, M., Boost, M. 2011. Are *qacG*, *qacH* and *qacJ* genes transferring from food isolates to carriage isolates of staphylococci?. *J. Hosp. Infect.* **80**: 95-96.

Referencias en línea

García J. 2002, Principales infecciones causadas por Enterobacterias. Disponible [En línea] en: <http://es.scribd.com/doc/46129932/Infecciosas-Farreras>. [Consulta: 10 marzo 2012]

Infecciones del Tracto Urinario. Libros Virtuales IntraMed [En línea]: http://www.intramed.net/sitios/librovirtual1/pdf/librovirtual1_51.pdf. [Consulta: 18 de marzo 2012]

Jiménez, R. 2003. Diagnóstico de infección del tracto urinario. *Unidad de Nefrología Infantil, Hospital Son Dureta* [En línea]: http://www.sepeap.org/imagenes/secciones/Image/USER/Expertos_infecciones_urinarias_diagnostico_tracto_urinario.pdf . [Consulta: 10 de marzo 2012]

Pumarola T. 2002. Infección y enfermedad infecciosa. Agentes infecciosos [En línea] en: <http://es.scribd.com/doc/46129932/Infecciosas-Farreras>. [Consulta: 10 marzo 2012]

Comparison study on disinfectant efficiency of ethanol, bleach and anti-bacterial hand soap against *E.coli* and mixed culture. [En línea] en: http://www.cte.ku.edu/gallery/visibleknowledge/sturm/files/Student%20Work%20Documents/final%20Lab%20Project/group_b_report.pdf. [Consulta: el 22 de abril de 2012]

http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2207.pdf. [Consulta: 05 de abril 2012]

<http://jindetres.blogspot.com/2011/01/adversarios-temibles.html> . [Consulta: 01 de febrero 2012]

<http://laenciclopediaagalactica.info/2011/12/compuestos-cuaternarios-de-amonio-qacs/> [Consulta: 01 de febrero 2012]

<http://www.ksbi.org/urinary-tract-infection.html>. [Consulta: 01 de abril 2012]

<http://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/quimica/desinfectantes-hipoclorito-de-sodio.htm>. [Consulta: 06 de enero 2012]