



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE RESISTENCIA A LOS  
ANTIMICROBIANOS Y CAPACIDAD DE  
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS  
DE *Shigella* spp.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller Marlui Michelle García Ramírez como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Lda. Indira Pérez

CARACAS, VENEZUELA  
MAYO 2018

## **DEDICATORIA**

Le dedico este trabajo al amor más puro, sincero y hermoso que pudo regalarme Dios, a ti  
mi pequeña Dulce María.

A mis padres, por ser los más maravillosos del mundo, por brindarme cada día su apoyo,  
motivarme frente a cada obstáculo y por llenarme de su amor incondicional.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque es el ser más grande y maravilloso, gracias por ayudarme en este camino, abrirme grandes puertas de bendición y nunca fallarme.

A mis padres, por motivarme y apoyarme a lo largo de mi carrera, por tener en ustedes siempre unos brazos prestos a recibirme, tener las palabras de aliento adecuadas para cada situación y por hacer siempre lo que estaba en sus manos para ayudarme, sin ustedes no habría podido cumplir muchos de mis objetivos, los amo con todo mi corazón.

A mi novio Juan Manuel, por apoyarme desde el inicio de mi carrera, por tu amor incondicional, por confiar en mí incluso cuando yo no lo hacía y por estar atento siempre que te hablaba sobre este trabajo, a pesar de que no entendías nada de lo que decía. ¡Te amo mi vida!

A mis grandes amigas, Katherine, Elisabeth, Esklenibel e Ingrid por estar siempre ahí para mí desde el principio, las quiero muchísimo.

A Mónica, por todos esos momentos de aprendizaje que tuvimos juntas en el laboratorio y por todas las risas que compartimos, no pude tener mejor compañera.

A mis profes queridos del sótano, por siempre estar atentos, dispuestos a brindar su apoyo y enseñanzas, a la profe Mina por permitirme ser tesista en el LBP y por sus enseñanzas y a mi tutora Índira por soportarme, responder siempre a todas mis preguntas y por ser la mejor.

Gracias a todos mis compañeros que estuvieron siempre atentos y a las personas que me ayudaron y apoyaron en el cumplimiento de esta meta.

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL  
DE GRADO DEL (A) Br. Marlui Michelle García Ramírez**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Marlui Michelle García Ramírez, C.I: 22382585, titulado **“Estudio de resistencia a los antimicrobianos y capacidad de formación de biopelículas en cepas de *Shigella* spp.”**, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 31 días del mes de mayo del año 2018, dejando constar que la Prof. Indira Pérez actuó como coordinadora del jurado examinador.



Prof. Victoria Navas





Prof. Andreina Fernandes



Prof. Indira Pérez  
(Tutor)

## RESUMEN

Las enfermedades causadas por alimentos contaminados constituyen el problema de salud pública más diseminado según la Organización Mundial de la Salud, generando diarreas agudas e incluso muertes debido a su ingesta. El principal agente infeccioso causante de disenterías en todo el mundo es el género bacteriano *Shigella*, cuyo principal reservorio es el hombre y su vía de transmisión fecal-oral.

La terapia de tratamiento de diversas enfermedades infecciosas y prevención de la contaminación por microorganismos consiste en el uso de agentes antimicrobianos como los antibióticos y biocidas; los antimicrobianos son sustancias químicas capaces de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos, sin embargo, su aplicación tiene poca efectividad debido a la resistencia manifestada ante estos agentes. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es la evaluación del fenotipo de resistencia a agentes antimicrobianos en forma de vida libre y formando biopelículas en cepas de *Shigella* spp.

Al evaluar los fenotipos de resistencia a antibióticos se obtuvo un 90,91% de resistencia a estreptomicina y a trimetoprim-sulfametoxazol, 27,27% de resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina, ceftazidima y tetraciclina y un 4,54% de resistencia a cefotaxima y kanamicina; mostrándose 100% de sensibilidad a los antibióticos cefoxitina, ceftriaxona, imipenem y amikacina, además, no se detectó la presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en ninguna de las cepas evaluadas. Por otro lado, se detectó la producción de exopolisacáridos a las 72h en todas las cepas de *Shigella* spp. donde el 4,54% son formadoras fuertes de biopelículas, 50% son formadoras moderadas, el 40,9% son formadoras débiles y 4,54% son no formadoras. En cuanto a los biocidas empleados creciendo en forma de vida libre, con cloro, el 4,54% presentó resistencia hasta el 1,5%; el 9,09% hasta el 1% y el 13,64% hasta el 0,5%; con vinagre, el 9,09% fueron resistentes al 30%. Formando biopelículas, el cloro las disminuye en el 50% de las cepas a las cuatro concentraciones ensayadas y el 45,45% de ellas no presentaron variación; en cuanto al vinagre, disminuye las biopelículas formadas en el 27,27% de las cepas a distintas concentraciones y en el 54,55% de las cepas se fomentó su formación.

Se espera contribuir con los estudios sobre el efecto de los antimicrobianos en cepas de *Shigella* spp. de origen clínico y alimentario y además sobre su capacidad de formación de biopelículas, cuyos estudios son pocos además de no encontrarse reportes en el país.

**Palabras clave:** *Shigella*, resistencia, biopelículas, antibióticos, cloro, vinagre, alimentos.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO .....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS).....	1
1.1.1 <i>Shigellas</i> : Enteropatógeno de importancia en salud pública.....	2
1.2 Agentes antimicrobianos .....	3
1.2.2 Clasificación de los biocidas según su actividad.....	6
1.2.3 Factores que afectan la potencia de los biocidas .....	7
1.2.4 Clasificación de los antimicrobianos.....	8
1.2.5 Mecanismos de resistencia bacteriana a antimicrobianos .....	12
1.3 Formación de biopelículas.....	14
1.3.1 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en biopelículas.....	17
2. ANTECEDENTES.....	19
2.1 Antecedentes internacionales .....	19
2.3 Antecedentes nacionales.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo general .....	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
5.1 Metodología general.....	30
5.2 Materiales .....	30
5.2.1 Reactivos .....	30
5.2.2 Medios de cultivo .....	31
5.2.4 Material biológico .....	33
5.3 Métodos .....	35
5.3.1 Corroboración microbiológica y bioquímica por pruebas tradicionales de cepas de <i>Shigella</i> spp. ....	35

5.3.2	Determinación del fenotipo de resistencia a distintos antibióticos mediante el método de difusión en disco en cepas de <i>Shigella</i> spp. ....	37
5.3.3	Detección de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) por prueba de sinergismo de doble disco en cepas de <i>Shigella</i> spp. ....	38
5.3.4	Determinación de la formación de biopelículas en cepas de <i>Shigella</i> spp. ....	38
1.	Método del agar rojo congo .....	38
2.	Método de ensayo en microplacas .....	39
5.3.5	Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas en cepas de <i>Shigella</i> spp. ....	39
5.3.5.1	Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas creciendo en forma de vida libre .....	39
5.3.5.2	Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas creciendo en biopelículas .....	41
5.3.5.2.1	Análisis estadísticos .....	42
6.	RESULTADOS .....	43
6.1	Corroboración microbiológica y bioquímica por pruebas tradicionales de cepas de <i>Shigella</i> spp. ....	43
6.2	Determinación del fenotipo de resistencia a distintos antibióticos mediante el método de difusión en disco en cepas de <i>Shigella</i> spp. ....	45
6.3	Detección de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) por prueba de sinergismo de doble disco en cepas de <i>Shigella</i> spp. ....	51
6.4	Determinación de la formación de biopelículas en cepas de <i>Shigella</i> spp. ....	52
6.4.1	Método del agar rojo congo .....	52
6.4.2	Método de ensayo en microplacas .....	54
6.5.1	Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas creciendo en forma de vida libre .....	56
6.5.2	Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas creciendo en biopelículas .....	62
7.	DISCUSIÓN .....	71
8.	CONCLUSIONES .....	92
9.	RECOMENDACIONES .....	95
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Clasificación de los biocidas según su estructura química.....	8
<b>Tabla II.</b> Clasificación de los antibióticos según su estructura química.....	9
<b>Tabla III.</b> Mecanismos de acción de los biocidas.....	10
<b>Tabla IV.</b> Discos de antibióticos, clasificación y concentraciones de uso evaluados en la determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos mediante la técnica de difusión en disco.....	32
<b>Tabla V.</b> Concentraciones del compuesto activo de los productos comerciales empleados como biocidas (cloro y vinagre), concentraciones del producto y de su compuesto activo utilizadas en las evaluaciones del fenotipo de resistencia a biocidas.....	33
<b>Tabla VI.</b> Nomenclatura y procedencia de las cepas de utilizadas en este estudio.....	34
<b>Tabla VII.</b> Resultados de las pruebas microbiológicas y bioquímicas en todas las cepas analizadas de <i>Shigella</i> spp.....	45
<b>Tabla VIII.</b> Resultado de los fenotipos de resistencia de las cepas de <i>Shigella</i> spp. obtenidos mediante el método de difusión en disco.....	47
<b>Tabla IX.</b> Perfiles y fenotipos de resistencia de las cepas de <i>Shigella</i> spp. obtenidos mediante el método de difusión en disco.....	49
<b>Tabla X.</b> Características de las colonias formadas por las cepas de <i>Shigella</i> spp. a los tiempos de incubación 24, 48 y 72 h.....	54
<b>Tabla XI.</b> Clasificación de las biopelículas formadas por las cepas de <i>Shigella</i> spp.....	55
<b>Tabla XII.</b> Resultado del control de toxicidad del caldo Letheen sobre las cepas de <i>Shigella</i> spp. evaluadas.....	57
<b>Tabla XIII.</b> Resultado del control de neutralización del agente antimicrobiano realizado a las cepas de <i>Shigella</i> spp. evaluadas.....	58
<b>Tabla XIV.</b> Resultados de la prueba de rapidez de muerte celular con cloro diluido al 0,5%, 1%, 1,5% y 2% en las cepas de <i>Shigella</i> spp. evaluadas.....	59
<b>Tabla XV.</b> Resultados de la prueba de rapidez de muerte celular con vinagre diluido al 20%, 30% y 40% en las cepas de <i>Shigella</i> spp. evaluadas.....	60
<b>Tabla XVI.</b> Resultado de la prueba de suspensión cuantitativa con cloro diluido al 0,5%, 1%, 1,5% y 2% en las cepas de <i>Shigella</i> spp. evaluadas.....	61

<b>Tabla XVII.</b> Resultado de la prueba de suspensión cuantitativa con vinagre diluido al 30% en las cepas de <i>Shigella</i> spp. evaluadas.....	62
<b>Tabla XVIII.</b> Biopelículas formadas con cloro diluido al 0,5%, 1%, 1,5% y 2%.....	66
<b>Tabla XIX.</b> Biopelículas formadas con vinagre diluido al 5%, 15%, 30% y 60%.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.....	14
<b>Figura 2.</b> Proceso de formación de biopelículas.....	17
<b>Figura 3.</b> Registro fotográfico de las pruebas de tinción Gram realizadas a cepas de <i>Shigella</i> spp. observadas al microscopio óptico con objetivo de 100x. ....	43
<b>Figura 4.</b> Resultados del crecimiento bacteriano en cepas de <i>Shigella</i> spp. en agar MacConkey.....	44
<b>Figura 5.</b> Fotografía del resultado de los antibiogramas generados para la cepa 370 <i>Shigella sonnei</i> proveniente de pacientes, mediante la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer.....	46
<b>Figura 6.</b> Porcentajes de resistencia obtenidos para cada antibiótico en las cepas de <i>Shigella</i> spp. evaluadas.....	48
<b>Figura 7.</b> Porcentajes de las cepas resistentes de <i>Shigella</i> spp. a uno o más antibióticos... 49	
<b>Figura 8.</b> Porcentajes de aparición de los distintos fenotipos de resistencia obtenidos para las cepas de <i>Shigella</i> spp. evaluadas .....	50
<b>Figura 9.</b> Fotografía de resultados de la prueba de sinergismo de doble disco para el control positivo y una cepa de <i>Shigella</i> spp. evaluada.....	52
<b>Figura 10.</b> Resultados obtenidos de la formación de biopelículas en agar rojo congo.....	53
<b>Figura 11.</b> Resultados de resistencia y sensibilidad en la prueba de rapidez de muerte celular a las 48 h de incubación.....	58
<b>Figura 12.</b> DO obtenidas para cada una de las cepas de <i>Shigella</i> spp. tratadas a distintas concentraciones de cloro.....	65
<b>Figura 13.</b> DO obtenidas para cada una de las cepas de <i>Shigella</i> spp. tratadas a distintas concentraciones de vinagre.....	68
<b>Figura 14.</b> Comparación de los datos de la prueba estadística de ANOVA de dos vías para las DO de las cepas de <i>S. sonnei</i> y <i>S. flexneri</i> formando biopelículas con y sin antimicrobianos (cloro y vinagre).....	70

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMC</b>	Amoxicilina/ácido clavulánico
<b>AMK</b>	Amikacina
<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARN<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARN<sub>t</sub></b>	Ácido ribonucleico de transferencia
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemist
<b>BIT</b>	Benzoisotazolina
<b>BLEE</b>	Betalactamasas de Espectro Extendido
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standars Institute
<b>CRO</b>	Ceftriaxona
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>CVCM</b>	Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EPS</b>	Exopolisacáridos
<b>ETAS</b>	Enfermedades transmitidas por alimentos
<b>FOX</b>	Cefoxitina
<b>IMP</b>	Imipenem
<b>KAN</b>	Kanamicina
<b>MIT</b>	Metilisotiazolinona
<b>PIA</b>	Polisacáridos de adhesión celular
<b>STR</b>	Estreptomina
<b>SXT</b>	Trimetoprin sulfametoxazol
<b>TCY</b>	Tetraciclina
<b>PBPs</b>	Proteínas de Unión a la Penicilina
<b>QACs</b>	Compuestos de amonio cuaternario
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS)**

La presencia de enfermedades causadas por alimentos contaminados continúa siendo un problema que afecta la salud pública e incluso el desarrollo económico a pesar de los avances y la existencia de nuevas tecnologías para la preparación de alimentos inocuos (Barrantes y col., 2006). Estas enfermedades han sido catalogadas por expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el problema de salud pública más diseminado (Barrantes y Achí, 2011); en 2010 los agentes alimentarios causantes de estas enfermedades causaron 600 millones de casos y 420000 muertes, siendo sus principales causantes los agentes etiológicos de enfermedades diarreicas, los cuales generaron 230000 muertes (OMS, 2015). Este problema afecta principalmente a la población infantil, estimándose que aproximadamente de los 7,6 millones de niños que mueren cada año, el 10,41% son por diarrea. Además, afecta también su crecimiento y desarrollo, ya que tienden a alcanzar niveles de desnutrición aguda y crónica (Riveros y Ochoa, 2015).

Desde el año 1950 se inició el uso generalizado de antibióticos con el fin de erradicar o controlar las enfermedades infecciosas que tantas muertes habían ocasionado, sin embargo, el uso indiscriminado, incontrolado y arbitrario de los antimicrobianos en la medicina humana, llevaron a la alteración del equilibrio entre los microorganismos y otros seres vivos como los mamíferos, promoviendo la selección de bacterias genéticamente resistentes a uno o varios antimicrobianos (multirresistencia); la aparición de un nuevo antimicrobiano y su uso incorrecto van seguidos de un proceso de desarrollo de resistencia al mismo en lapsos de 2 a 10 años, ya que cepas susceptibles desaparecen y se propagan las resistentes, llevando al fracaso de terapias donde es necesaria la aplicación del agente antimicrobiano para erradicar la infección (Carmona y Silva, 2002).

Los patógenos asociados con las enfermedades diarreicas implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos, incluyen virus (rotavirus, norovirus, astrovirus y adenovirus entéricos), bacterias (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *Escherichia coli* diarrogénica, *Aeromonas* spp., *Yersinia* spp., entre otros), y parásitos (*Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Cyclospora* spp., *Microsporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Balantidium coli*) (Riveros y Ochoa, 2015).

### **1.1.1 *Shigellas*: Enteropatógeno de importancia en salud pública**

La *Shigella* es un género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no motil, fermentador y oxidasa negativa (Prescott y col., 2004). Existen cuatro especies que constituyen este grupo: *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella dysenteriae*. Esta bacteria es la principal causa de disentería en niños y adultos de todo el mundo, cuyas manifestaciones clínicas dependen de la especie, siendo *S. dysenteriae* la que está asociada con una mayor severidad debido a la toxina shiga que produce, siendo única en esta especie, la cual genera el síndrome urémico hemolítico. *S. sonnei* presenta un cuadro clínico más leve que *S. flexneri*, la cual produce mayormente diarrea acuosa (Riveros y Ochoa, 2015), además, *S. flexneri* presenta una toxina que compromete neurológicamente al infectado (Ayala y col., 2006).

El principal reservorio de esta bacteria es el hombre, siendo su vía de transmisión fecal-oral, pudiéndose transmitir fácilmente por las manos. Su transmisión está asociada con la pobreza, falta de higiene y consumo de agua y alimentos contaminados, principalmente en países en vías de desarrollo (Riveros y Ochoa, 2015).

Su tratamiento consiste en el uso antibióticos, donde la OMS recomienda como tratamiento de primera línea la ciprofloxacina y de segunda línea la ceftriaxona o azitromicina, sin embargo, la resistencia a antimicrobianos constituye un gran problema ya que se han

reportado resistencias a antibióticos como el ácido nalidíxico, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina, cefalosporinas de tercera generación y presencia de cepas con producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M, producidas generalmente en bacterias Gram negativas, encontradas y descritas en enterobacterias (Riveros y Ochoa, 2015); estas enzimas confieren resistencia de alto nivel a antibióticos como cefuroxima, cefotaxima y cefepime (Lezameta y col., 2010).

## **1.2 Agentes antimicrobianos**

Un agente antimicrobiano es un compuesto químico, natural o sintético que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos (Madigan y col., 2004). Según su efecto pueden ser “biocidas” y “bioestáticos”. Los agentes bacteriostáticos inhiben el crecimiento de forma reversible, si el agente se elimina, los microorganismos se recuperarán y volverán a crecer, es decir, no destruyen directamente al patógeno y la eliminación de la infección depende de los mecanismos de resistencia del huésped, por lo que el antimicrobiano puede ser ineficaz si la resistencia es baja. Los agentes biocidas matan las células pero no las lisan, uniéndose fuertemente a sus dianas celulares de acción, su actividad depende de la concentración, a concentraciones bajas pueden ser sólo “estáticos”. El efecto de un agente varía según la especie bacteriana, pudiendo ser “cida” para una especie y “estático” para otra (Prescott y col., 2004). También existen los agentes “líticos”, que son biocidas que lisan células, detectándose por el descenso de número de células o turbidez al agregar el agente (Madigan y col., 2004).

Los antimicrobianos de tipo biocidas pueden ser antisépticos, desinfectantes, preservantes y esterilizantes (Sheldon, 2005):

- Los antisépticos pueden ser biocidas o bioestáticos, inhibiendo o destruyendo la forma vegetativa de los microorganismos, pudiéndose aplicar en la piel y tejidos vivos (Sheldon, 2005).

- Los desinfectantes son biocidas que destruyen la forma vegetativa de los microorganismos y se usan en objetos inanimados como en instrumentos médicos, y superficies e incluso alimentos (Sheldon, 2005).

Entre los antisépticos y desinfectantes están los detergentes, compuestos fenólicos, alcoholes, ácidos y bases fuertes, ácidos orgánicos, metales pesados, agentes oxidantes, colorantes y agentes alquilantes (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005).

- Los preservantes o conservantes y aditivos son utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, con el fin de limitar el crecimiento de microorganismos que puedan dañar el producto, entre ellos están diversos ácidos orgánicos, ésteres de ácidos orgánicos, nitritos y sulfitos (Russell, 1990). Además, estas sustancias se añaden a los productos para protegerlos de otras alteraciones biológicas, físicas y químicas (Villada, 2010).

- Los esterilizantes son desinfectantes que matan todos los tipos de vida microbiana y son usados para esterilizar donde no puede usarse el calor o radiación para descontaminar y esterilizar, entre estos dos tipos de agentes está el alcohol, detergentes catiónicos, especialmente compuestos de amonio cuaternario, compuestos clorados, sulfato de cobre, óxido de etileno (gaseoso), formaldehído, glutaraldehído, peróxido de hidrógeno, compuestos yodóforos, dicloruro de mercurio, ozono, ácido peracético y compuestos fenólicos (Madigan y col., 2004).

Un gran uso de importancia de los antimicrobianos es como agentes quimioterapéuticos, en enfermedades infecciosas, estos son los que pueden usarse por vía interna, ya que no son tóxicos para el cuerpo humano. Estos agentes poseen toxicidad selectiva ya que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos sin afectar al hospedador, estos son los antibióticos. Entre los agentes sintéticos están los análogos a los factores de crecimiento, los cuales bloquean la utilización de dicho factor por su relación o semejanza con este, dos de ellos son las sulfamidas y las isoniazidas. Otro agente sintético lo constituyen las quinolonas, que son un tipo de antibiótico sintético que interacciona con la ADN girasa bacteriana, impidiendo así el empaquetamiento del mismo en la célula, el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina son ejemplos de este tipo de antibióticos (Madigan y col., 2004).

Existen agentes antimicrobianos naturales, que son producidos por microorganismos a gran escala, entre ellos están los antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas (Madigan y col., 2004). Otros agentes antimicrobianos naturales lo constituyen los compuestos orgánicos, entre ellos el diacetilo y acetaldehído con efectos bactericidas en Gram negativas y bacteriostáticos en Gram positivas, compuestos usados como desinfectantes, entre ellos alcoholes como el etanol y butanol, ácidos orgánicos como el ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, además otros tipos de compuestos como el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Mora y García, 2007).

### **1.2.1 Diferencias y similitudes entre biocidas y antibióticos**

La diferencia entre ambos tipos de antimicrobianos radica en los blancos de acción. La mayoría de los antibióticos inhiben un blanco específico en algún proceso celular, esta toxicidad selectiva surge debido a que el proceso involucrado está ausente o es totalmente distinto en el huésped, en contraste, los biocidas poseen múltiples sitios blancos

dependientes de la concentración, con un efecto sutil a bajas concentraciones y más dañino y efectivo a concentraciones más altas (Russell, 2003).

En cuanto a las similitudes, incluyen la entrada de agentes catiónicos en bacterias Gram negativas, por ejemplo: compuestos de amonio cuaternario (QACs) (biocida) y polimixina (antibiótico); la entrada por difusión pasiva de la mayoría de biocidas y antibióticos en algunas bacterias Gram positivas; diversos tipos de daño celular similares, por ejemplo, el daño a la membrana citoplasmática por parte de biocidas como alcoholes, QACs, sales de clorhexidina (CHX), compuestos fenólicos, triclosan y antibióticos como las polimixinas y estreptomicina; también sitios blanco compartidos entre antimicrobianos, por ejemplo, biocidas como acridinas, CHX y compuestos de plata, así como antibióticos como las mitomicinas, la actinomicina, las fluoroquinolonas y la novobiocina ejercen efectos sobre el ADN (Russell, 2003).

### **1.2.2 Clasificación de los biocidas según su actividad**

Los biocidas tienen grados variables de actividad sobre los diferentes grupos de microorganismos, estos se pueden clasificar en tres categorías según su potencia y efectividad contra los microorganismos (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005):

- De bajo nivel: Destruyen la mayor parte de las formas vegetativas bacterianas, Gram positivas y Gram negativas, algunos virus con envoltura lipídica y hongos levaduriformes, a excepción de *Mycobacterium* spp. ni esporas (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005).
- De nivel intermedio: Inactivan todas las formas bacterianas vegetativas, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, la mayoría de virus con o sin envoltura y hongos filamentosos pero no necesariamente esporas (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005).

- De alto nivel: Consiguen destruir todos los microorganismos, excepto algunas esporas (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005).

### **1.2.3 Factores que afectan la potencia de los biocidas**

- Concentración o intensidad del agente y tiempo de actuación: Por lo general, cuanto más concentrado esté un agente químico o más intenso sea uno físico, se reducirá más rápido la carga microbiana; lo mismo sucede con el tiempo de exposición, cuanto más tiempo se exponga una población a un agente biocida, más microorganismos se destruirán (Prescott y col., 2004). Si se modifica la concentración, se provocan cambios en el tiempo para lograr un mismo efecto. (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005).
- pH: Afecta tanto la carga de la membrana plasmática bacteriana, como el grado de ionización del agente. Las formas ionizadas de los agentes disociables atraviesan mejor las membranas biológicas, siendo más efectivos. Los agentes aniónicos suelen ser más efectivos a pH ácidos y los catiónicos a pH alcalinos (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005).
- Temperatura: Generalmente, al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Muchos agentes duplican su tasa de muerte al aumentar 10 °C la temperatura (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005).
- Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana: La especie, fase de crecimiento y presencia de cápsula o esporas y número de microorganismos afecta la potencia. La presencia de cápsula o esporas suelen conferir más resistencia (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005). Una población mayor necesitará más tiempo para morir que una más pequeña, ya que en cada intervalo de tiempo se destruye una fracción igual de población microbiana (Prescott y col., 2004).

- Presencia de materia orgánica del microorganismo o del hospedador: La presencia de sangre, suero o pus afecta negativamente la potencia de antimicrobianos de tipo oxidante y desnaturizante de proteínas hasta el punto de inactivarlos (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005). La materia orgánica protege a los microorganismos frente al calor y antimicrobianos; por esta razón las biopelículas son a menudo difíciles de eliminar, por la presencia de la matriz que los rodea (Prescott y col., 2004).

## 1.2.4 Clasificación de los antimicrobianos

### 1.2.4.1 Según su estructura química

En la tabla I se muestra la clasificación de los biocidas según su estructura química:

**Tabla I.** Clasificación de los biocidas según su estructura química (Gnanadhas y col., 2013).

Clasificación	Ejemplo	Clasificación	Ejemplo	Clasificación	Ejemplo
Derivados del imidazol	Diazolidinyl urea	Colorantes	Acridinas Quinonas	Vapores	Ozono Etileno Óxido de propileno
Fenoles	Cresoles Halo-nitrofenoles Bis-fenoles	Halógenos	Compuestos con yodo	Quinolinas y derivados de isoquinolinas	4-aminoquinaldinio B-hidroxiquinolina
Ácidos orgánicos e inorgánicos: ésteres y sales	Fórmico Acético Salicílico Sulfitos	Compuestos clorados	Compuestos liberadores de cloro Cloroformo	Alcoholes	Etil Metil Isopropil Bronopol
Diamidinas aromáticas	Propamidina Dibromopropamidina	Compuestos con bromo	Derivados alcalinos de bromo	Peroxinógenos	Peróxido de hidrógeno Ácido paracético
Biguanidas	Clorhexidina Alexidina Biguanidas poliméricas	Isotiazolonas	BIT MIT	Derivados de metales pesados	Cobre Plata Mercurio
Agentes activos de superficie	Compuestos de amonio cuaternario Aniónicos No iónicos y anfotéricos	Derivados de hexamina	Triazinas Oxazoles Captan	Anilidas	Carbanilidas Salicilidas
Aldehídos	Glutaraldehído Formaldehído	Terpenos	Limoneno	Derivados de 1,3-dioxano	Dimetoxano Bronidox

Por su parte, los antibióticos pueden ser clasificados de la siguiente manera:

**Tabla II.** Clasificación de los antibióticos según su estructura química (Modificado de Madigan y col., 2004).

Clasificación	Ejemplo	Clasificación	Ejemplo	Clasificación	Ejemplo
Compuestos que contienen carbohidratos: azúcares, aminoglucósidos, ortomicinas, glucopeptidos, glucolípidos	Amikacina Kanamicina Estreptomicina Vancomicina Moenomicina	Derivados alicíclicos: esteroideos, derivados del cicloalcano	Cicloheximida Ácido fusídico	Aminoácidos y análogos peptídicos: derivados de aminoácidos, $\beta$ -lactámicos, peptídicos, formadores de quelato	Bacitracina Actinomicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina imipenem, meropenem, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona
Lactosas macrocíclicas: macrólidos, poliénicos, ansamicinas, macrotetrólidos	Eritromicina Candidina Rifampicina	Compuestos aromáticos: condensados, éter aromáticos, derivados del benceno	Cloranfenicol Griseofulvina Novobiocina		
Quinonas y compuestos relacionados: tetraciclinas, antraciclinas, naftoquinonas, benzoquinonas	Tetraciclina Adriamicina Actinorrodina	Compuestos alifáticos: compuestos que contienen fósforo	Fosfomicina	Oxazolidinona: lactona cíclica	2-Oxazolidinona
Compuestos quinolónicos	Ácido nalidíxico Ciprofloxacina	Compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno: poliéter	Monensina	Compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno: nucleosídicos	Polioxinas Trimetoprin

#### 1.2.4.2 Según su mecanismo de acción

De forma general, existen tres mecanismos de acción en biocidas: daño a la membrana por parte de los detergentes, compuestos fenólicos y alcoholes; destrucción de proteínas por los ácidos y bases fuertes y ácidos orgánicos y modificadores de grupos funcionales como los metales pesados, agentes oxidantes y colorantes (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005), sin

embargo, un determinado biocida puede tener diversos mecanismos de acción, a continuación se presentan algunos de ellos:

**Tabla III.** Mecanismos de acción de los biocidas (Tomado de McDonnell y Russell, 1999 con modificaciones de Sheldon, 2005).

<b>Blanco</b>	<b>Biocida</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Envoltura celular (pared celular, membrana externa)	Glutaraldehido	Unión cruzada a grupos amino de la membrana externa, la pared celular pierde su función.
	EDTA, otros permeabilizadores	Remoción de Mg <sup>+</sup> , liberación de algunos LPS en bacterias Gram negativas
Citoplasma (membrana interna)	QACs	Unión a fosfolípidos, dañando la estructura de la bicapa lipídica
	Clorhexidina	Bajas concentraciones: afectan la integridad de la membrana colapsando el potencial de membrana, altas concentraciones: coagulan el citoplasma
Unión cruzada a macromoléculas	Formaldehido	Unión cruzada a proteínas, ARN y ADN
	Glutaraldehido	Unión cruzada a proteínas de la envoltura celular y otros sitios de la célula por la interacción con grupos tiol, sulfhidrilos y aminos, inhibiendo la síntesis de proteínas, ARN y ADN.
Intercalación con el ADN	Acridinas	Intercalación de la acridina entre dos segmentos de pares de bases del ADN
Interacción con grupos tiol	Compuestos de plata	Interacción con enzimas unidas a la membrana
Efectos en el ADN	Halógenos (Cl, Br, I) Peróxido de hidrógeno, iones plata	Inhibición de la síntesis de ADN Ruptura de las hebras de ADN
Agentes oxidantes	Halógenos	Oxidación de grupos tiol a disulfitos, sulfoxidos o disulfóxidos causando la destrucción de la actividad celular de las proteínas y disrupción de la fosforilación oxidativa y otras actividades asociadas a la membrana
	Peroxígenos	Peróxido de hidrógeno: Conduce a la formación de radicales libres OH <sup>•</sup> , que oxidan los grupos tiol en enzimas y proteínas, además oxidan lípidos y ADN

Por otro lado, según su mecanismo de acción, los antibióticos se pueden clasificarse en:

- Inhibidores de la síntesis de la pared celular: Se unen a las transpeptidasas impidiendo el entrecruzamiento de dos cadenas de peptidoglicano, debilitándose la pared

celular a medida que se va formando. Entre ellos están los  $\beta$ -lactámicos (Madigan y col., 2004).

- Inhibidores del metabolismo del ácido fólico: Actúan como análogos de factores de crecimiento. Entre ellos están la trimetoprima y las sulfamidas como el sulfametoxazol (Madigan y col., 2004).

- Daño de la estructura de la membrana citoplasmática: Se fija a los fosfolípidos de las membranas de las células bacterianas aumentando su permeabilidad. La polimixina es un ejemplo de estos antibióticos (Madigan y col., 2004).

- Inhibición de la elongación del ARNm: Inhiben la transcripción uniéndose en el complejo de iniciación del ADN evitando la elongación por la ARN polimerasa. Un ejemplo de esto es la actinomicina (Madigan y col., 2004).

- Acción sobre la ADN girasa: Impiden la producción del ADN superenrollado. Entre ellos están las quinolonas como el ácido nalidíxico, ciprofloxacina y novobiocina (Madigan y col., 2004).

- Acción sobre la ARN polimerasa: Se unen con la subunidad  $\beta$  de la polimerasa de ARN que depende de ADN, impidiendo la síntesis de ARN. Entre ellas están la rifampicina y la estreptovaricina (Madigan y col., 2004).

- Inhibición de la síntesis de proteínas (subunidad 50S): Se unen a la subunidad 50S impidiendo la translocación de aminoácidos en la traducción. Entre ellos están los macrólidos, cloranfenicol, clindamicina y lincomicina (Madigan y col., 2004).

- Inhibición de la síntesis de proteínas (subunidad 30S): Se unen a la subunidad 30S impidiendo que el ARNt se una a este ni se transporten a la subunidad 50S. Entre ellos

están las tetraciclinas, espectinomicina, aminoglicósidos como la estreptomicina, amikacina y kanamicina y nitrofuranos (Madigan y col., 2004).

- Inhibición de la síntesis de proteínas (ARNt): Causa la terminación prematura de la traducción actuando como el extremo 3' del ARNt aminoacilado. Entre ellos están la mupirocina y puromicina (Madigan y col., 2004).

### **1.2.5 Mecanismos de resistencia bacteriana a antimicrobianos**

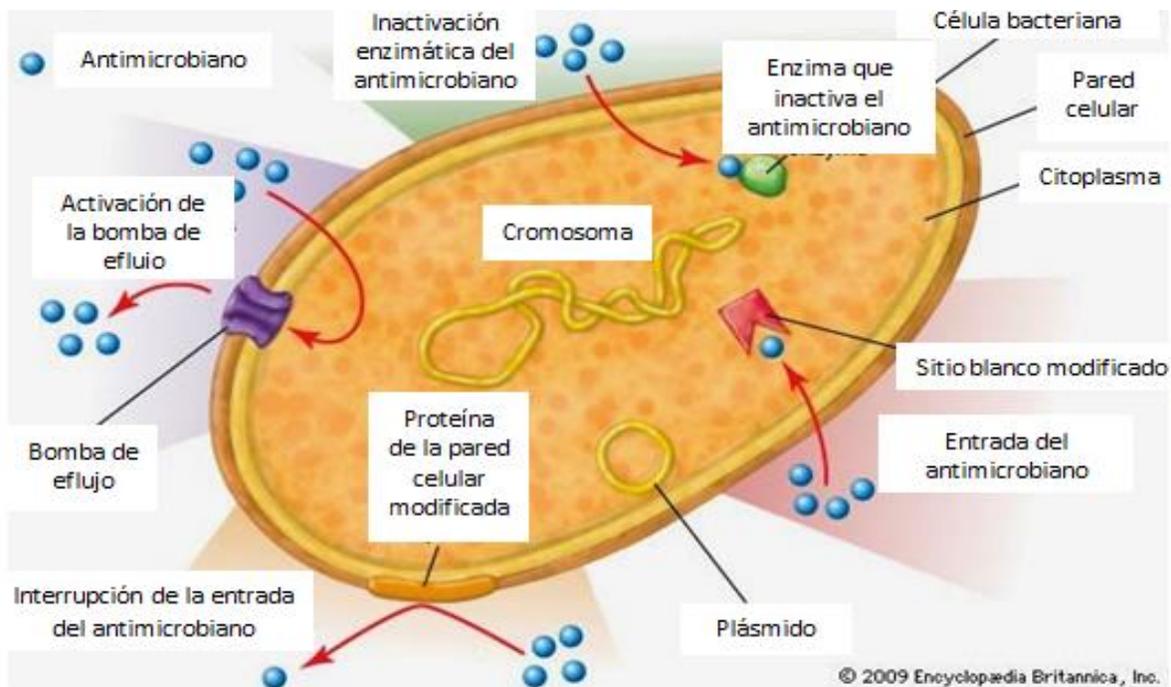
La resistencia a antimicrobianos puede generarse de dos formas: la natural o intrínseca que es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, y la adquirida que es variable y obtenida por una cepa en función de la variabilidad genética bacteriana, ya sea por mutaciones o por la adquisición de material genético exógeno mediante mecanismos transferencia horizontal entre células, de la misma o distintas especies. Estos genes de resistencia se pueden codificar en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos, transposones) (Vignoli y Seija, 2006). Los mecanismos de resistencia natural o intrínseca pueden involucrar impermeabilidad de la membrana, eflujo, formación de biopelículas, inactivación enzimática, estructura de la pared celular y formación de esporas, por otro lado, los mecanismos de resistencia adquirida pueden involucrar modificación del sitio blanco, eflujo, reacciones enzimáticas y cambios en la envoltura celular (Sheldon, 2005). A continuación se muestran los principales mecanismos de resistencia:

- Inactivación enzimática: Mediante reacciones enzimáticas que inactivan al antimicrobiano, por ejemplo, reacciones hidrolíticas en el caso de las  $\beta$ -lactamasas que inactivan  $\beta$ -lactámicos, reacciones de acetilación, adenilación o fosforilación que inactivan aminoglicósidos, la formaldehído deshidrogenasa que inactiva al formaldehído y enzimas que hidrolizan tolueno y fenol (Vignoli y Seija, 2006 y McDonnell y Russell, 1999).

- Modificaciones en el sitio del blanco: Por modificaciones en el gen que codifica el blanco, o por la adquisición de genes que codifican para sustitutos de los blancos originales (Vignoli y Seija, 2006). Por ejemplo, la duplicación del sitio blanco en el caso de didrofolato reductasa, le confiere menor susceptibilidad al microorganismo ante la trimetoprima (Russell, 2003)

- Alteraciones en la permeabilidad de la membrana: En el caso de bacterias Gram negativas, la membrana externa es rica en lípidos y es impermeable a sustancias hidrofílicas, por lo que sólo pueden penetrar la membrana por medio de porinas, en bacilos Gram negativos sustancias de gran tamaño como la penicilina y vancomicina son incapaces de pasar a través de la membrana, también ocurre la pérdida o disminución de la expresión de porinas, por lo que la entrada de los fármacos a través de la membrana se ve reducido (Vignoli y Seija, 2006). Además, cambios en la composición de las proteínas y ácidos grasos involucran alteraciones en la permeabilidad y estructura de la membrana, confiriéndole mayor resistencia a ciertos antimicrobianos (Sheldon, 2005).

- Eflujo: Las bombas de eflujo pueden expulsar un gran rango de componentes diferentes (Cloete, 2003). En Gram negativos estos sistemas se constituyen por tres proteínas, una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, una con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa. Por ejemplo, puede haber un aumento en la salida de antibióticos por eflujo expulsando  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol (Vignoli y Seija, 2006).



**Figura 1.** Mecanismos de resistencia a antimicrobianos. (Tomado y modificado de: <https://global.britannica.com/science/antibiotic-resistance>) [Consulta: marzo de 2018].

### 1.3 Formación de biopelículas

Las biopelículas consisten en comunidades de microorganismos inmovilizados sobre una superficie, los cuales están embebidos en una matriz de polímero orgánico de origen microbiano (exopolisacárido), pudiéndose desarrollar en cualquier superficie biótica o abiótica (Prescott y col., 2004). Las biopelículas se pueden conformar de una o varias especies de microorganismos viables y no viables, y su crecimiento se da de manera distinta a como crecen de forma planctónica (vida libre) (Navia y col., 2010).

La matriz extracelular se constituye de exopolisacáridos (EPS) polianiónicos fijados a la superficie y pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y otras sustancias poliméricas hidratadas, con un porcentaje de agua entre 85% y 95%. Dicha matriz protege a los microorganismos de agentes antimicrobianos, previenen al acceso de biocidas, secuestrantes metálicos, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la

resistencia de los microorganismos que conforman la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes (Navia y col., 2010).

La formación de biopelículas por las diferentes especies de microorganismos ha sido ampliamente estudiada y se conoce el proceso mediante el cual se produce: las bacterias en su forma planctónica se adhieren a una superficie y crean una microcolonia, la cual posteriormente generará la biopelícula por medio de comunicación celular generada por la activación de señales químicas. En estudios recientes, se ha descubierto que una colonia bacteriana de vida libre posee una estructura interna similar a las biopelículas bacterianas y además un comportamiento similar, por lo que esta puede considerarse como un paso previo a su formación (Gómez y col., 2013).

El proceso de formación de biopelículas inicia con la adherencia de células a la superficie, formando microcolonias por la activación de sus genes con la producción de EPS y posterior maduración de la biopelícula (Navia y col., 2010).

Previamente al proceso de adhesión, ocurre una fase de acondicionamiento donde los componentes orgánicos del medio forman una cubierta que neutraliza la carga excesiva de la superficie, iniciando la adhesión, estos compuestos orgánicos pueden servir como nutrientes a los microorganismos (Castrillón y col., 2010).

El mecanismo de adhesión puede ser activo o pasivo dependiendo de la motilidad celular. La adhesión pasiva se da por la gravedad, difusión y dinámica del fluido y la activa se da por medio de flagelos, pili, proteínas de acción, cápsulas y carga de superficies. El proceso de adhesión se constituye de un estado reversible seguido de uno irreversible. La fase reversible involucra fuerzas físicas como las electrostáticas, estéricas, van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Navia y col., 2010). En la fase reversible, los microorganismos libres forman una capa que se adsorbe a la superficie por periodos cortos, donde se van

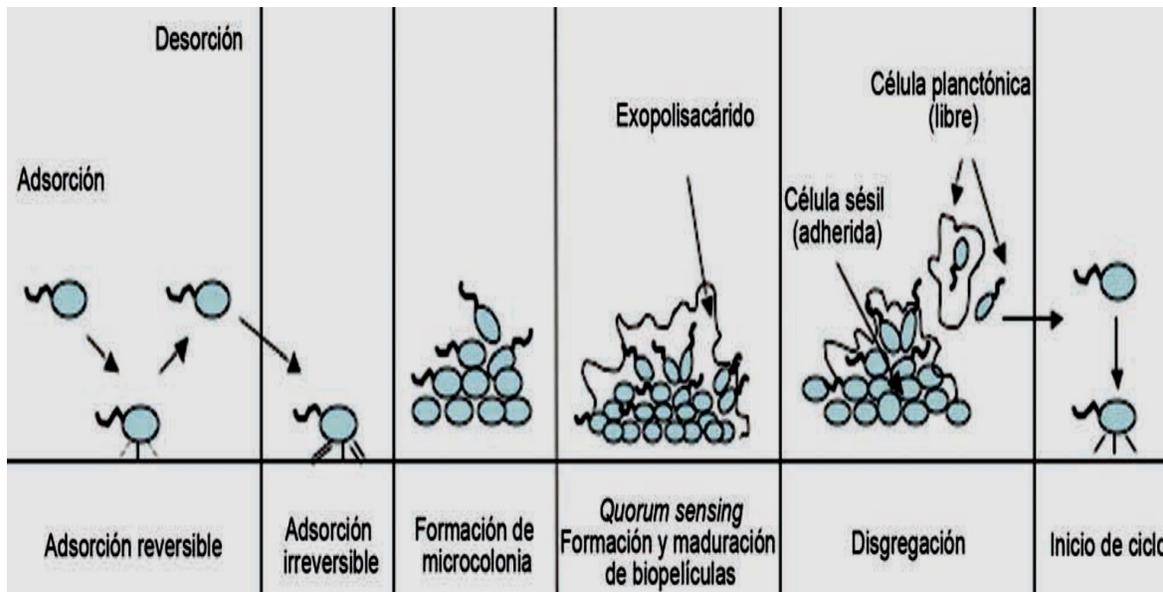
agregando los microorganismos a la superficie condicionada, proceso favorecido por los mecanismos de adhesión activa (Castrillón y col., 2010).

En la segunda fase, un número de células adsorbidas reversiblemente permanecen inmovilizadas y se adsorben irreversiblemente por los apéndices físicos de la bacteria, estimulando las reacciones químicas de oxidación e hidratación permitiendo la formación de enlaces fuertes con la superficie (Navia y col., 2010). Una vez lograda la adhesión irreversible, las células se dividen y colonizan la superficie y cuando la concentración local de señales químicas producidas por el metabolismo microbiano alcanza un nivel umbral, sugiere que la población microbiana ha alcanzado una densidad mínima, condicionando el inicio de cambios fenotípicos en la comunidad (Castrillón y col., 2010).

En la fase de crecimiento estacionaria las células se dividen a la misma velocidad con la que mueren; a una alta concentración de células, una serie de mecanismos de señalización celular son empleados por los microorganismos de la biopelícula, involucrándose sistemas de autoinducción (Navia y col., 2010). Al proceso en el que una célula percibe la proximidad de otras células y genera señales químicas que corresponden con metabolitos secundarios, se le conoce como *quorum sensing*, el cual trae como consecuencia la autoinducción en la síntesis de la matriz extracelular o EPS, logrando la maduración de la biopelícula. Cuando en el medio extracelular se acumulan cantidades suficientes de moléculas autoinductoras, se activan receptores específicos que alteran la expresión de genes, afectando distintos fenotipos (Castrillón y col., 2010).

La fase de muerte se relaciona con el desprendimiento de la biopelícula de la superficie donde se encuentra adherida, dicho desprendimiento es generado por acción de las enzimas producidas por los mismos microorganismos, los cuales rompen los polisacáridos de la

biopelícula, permitiéndole a los microorganismos liberados la colonización de sustrato fresco, donde se reanuda el ciclo de formación (Navia y col., 2010).



**Figura 2.** Proceso de formación de biopelículas (Tomado de Castrillón y col., 2010).

Las bacterias organizadas formando biopelículas presentan diferencias fenotípicas, bioquímicas y morfológicas respecto en forma de vida plánctónica, permitiéndole a las bacterias la supervivencia dentro de la biopelícula. La hostilidad del entorno y cantidad de nutrientes inducen un cambio de comportamiento a las comunidades microbianas permitiéndoles adaptarse a su entorno (Gómez y col., 2013).

### 1.3.1 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en biopelículas

Los mecanismos de resistencia en biopelículas no se conocen en su totalidad, sin embargo, se han propuesto los siguientes:

- **Reducción del antimicrobiano:** Se refiere a reacciones de neutralización entre el antimicrobiano y los constituyentes de la biopelícula disminuyendo la concentración del mismo. Mientras la concentración se ve mantenida en forma de vida plánctónica, en forma de vida de biopelículas, esta se ve disminuida (Stewart y col., 2004).

- Penetración lenta del antimicrobiano a la biopelícula: La presencia de la matriz de EPS, disminuye la capacidad de penetración de los agentes antimicrobianos dentro de la matriz ya que limita su transporte hasta las células, retardando su efecto (Davies, 2003).
- Crecimiento bacteriano lento: Los microorganismos que se encuentran en fase de crecimiento estacionaria o que no están creciendo, son menos susceptibles a un amplio rango de antimicrobianos, en biopelículas, el crecimiento bacteriano es lento debido a la baja cantidad de nutrientes o aceptores electrónicos, otra versión es que el microambiente alterado en cuanto a condiciones de bajo pH o anoxia, son antagónicas a la acción del antimicrobiano (Stewart y col., 2004).
- Respuestas al estrés: Los microorganismos poseen diversos sistemas genéticos y bioquímicos de respuesta ante diversas condiciones de estrés, estos incluyen respuestas adaptativas al estrés oxidativo, condiciones nutritivas e hídricas bajas, daño al ADN, entre otras, que pueden ser expresadas de manera constitutiva en forma de vida de biopelículas o se expresan de una manera más efectiva en ellas que en forma de vida planctónica una vez que el agente antimicrobiano está presente (Stewart y col., 2004).
- Persistencia: La persistencia es un estado de quiescencia donde las células no crecen y no mueren al ser expuesta ante un agente antimicrobiano, siendo un fenotipo no heredable expresado mayoritariamente bajo condiciones de estrés. Las biopelículas contienen células persistentes en una frecuencia de cien a diez mil veces mayor que cuando se encuentran creciendo en forma de vida libre (Harrison y col., 2007). En la mayoría de los casos, las células persistentes sólo constituyen 1% o menos de la población en biopelículas, a pesar de ser un número pequeño, es suficiente para protegerla ante agentes físicos y químicos. Estas células pueden retornar a su estado susceptible (Stewart y col., 2004).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Antecedentes internacionales

En el año 2004, Merino y colaboradores, en Argentina, evaluaron la resistencia a antibióticos en 132 cepas de *Shigella* spp. a partir de muestras de heces de pacientes con diarrea y las caracterizaron molecularmente. *S. flexneri* correspondió a un 78% de las cepas y *S. sonnei* a un 22%. *S. flexneri* presentó mayor resistencia a los antibióticos que *S. sonnei* frente a la ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y ampicilina/sulbactam, y también presentaron mayor número de cepas multirresistentes, siendo resistentes hasta a ocho antibióticos y *S. sonnei* a seis.

En el año 2005, en Indonesia, Agtini y colaboradores realizaron un estudio de vigilancia comunitaria en especies de *Shigella* spp. y *Vibrio cholerae* aisladas de pacientes con síndromes diarreicos. Los niños fueron los más susceptibles a estas enfermedades, apareciendo mayormente en niños menores de 5 años, predominando en el género masculino, siendo los de 1 y 2 años los que mayormente desarrollan shigelosis. De los aislados de *Shigella*, 72% fueron *S. flexneri*, 23% *S. sonnei*, 2% *S. dysenteriae* y 3% *S. boydii*. De las especies de *S. flexneri*, entre el 73% y el 95% presentaron resistencia a la ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol y tetraciclina, siendo sensibles a ácido nalidíxico, ciprofloxacina y ceftriaxona. Por su parte, el cólera fue también el más común en niños con la mayor incidencia en menores de 1 año. Más del 90% de los aislados de *V. cholerae*, fueron susceptibles a trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina y cloranfenicol.

En Colombia, en el año 2015, Vélez y colaboradores realizaron un estudio de vigilancia molecular en aislados clínicos de pacientes con enfermedades diarreicas agudas causadas por *Shigella sonnei*. De 102 aislamientos seleccionados, el 63,8% presentó resistencia a tres

o más familias de antibióticos, el patrón más frecuente correspondió a tetraciclina, cloranfenicol y amoxicilina/ácido clavulánico; el patrón tetraciclina-cloranfenicol-trimetoprima-sulfametoxazol-amoxicilina-ampicilina fue el más frecuente relacionado con cuatro familias de antibióticos. El 26,4% de los aislados presentaron resistencia a una o dos familias de antibióticos y el 9,8% fueron sensibles. Lograron establecer una correlación de los patrones moleculares del ADN bacteriano con el patrón de resistencia a los agentes antimicrobianos, dichos patrones moleculares fueron obtenidos mediante la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado utilizando la enzima de restricción XbaI.

En el año 2016, Tijerino y colaboradores, en Costa Rica, analizaron 4363 aislados de *Shigella* y 1785 de *Salmonella*, con el fin de conocer la circulación del mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos. De 24 aislamientos de *Shigella*, 15 correspondieron a *S. sonnei* y 9 de *Salmonella*, 4 de origen clínico y 5 aviares de la industria alimenticia, con fenotipos sospechosos de portar la enzima  $\beta$ -lactamasa *AmpC* plasmídica, pertenecientes al tipo *CMY-2* confirmado mediante PCR. Los 24 aislados presentaron sensibilidad reducida a ceftazidima y cefotaxima con zonas de inhibición con sospecha de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), se descartó su presencia ya que no presentó agrandamiento igual o mayor a 5mm, ni la inhibición “efecto huevo” al combinarlos con amoxicilina-ácido clavulánico, todos presentaron zonas de inhibición para los carbapenémicos, se confirmó el mecanismo en estas especies por la sinergia observada entre cefoxitina, ceftazidima y cefotaxima con ácido borónico.

Internacionalmente son pocos los estudios en cuanto a los efectos de antimicrobianos como el ácido acético y el cloro en *Shigella* spp. En este sentido se presentan además estudios con otras especies que sirvieron de base para nuestro trabajo de investigación: Uno de estos estudios fue en Japón en 1999, por Akiyama y colaboradores. Estos investigadores

estudiaron los efectos del ácido acético de grado molecular en biopelículas inmaduras de *Staphylococcus aureus* y su efecto en la coagulación del plasma debido a las coagulasas de este microorganismo. Utilizaron dos concentraciones distintas de este antimicrobiano, 0,25% y 2,5%, y usaron dos cepas aisladas de lesiones cutáneas, impétigos y furúnculos, estas cepas presentan capacidad de formación de biopelículas maduras luego de las 72 horas a 37°C. Las cepas no mostraron coagulación plasmática detectable luego de 6, 24 o 48 horas de incubación con ambos antimicrobianos, pero si la mostraron sin los antimicrobianos, lo que demostró indirectamente que el crecimiento del microorganismo se ve inhibido por este antimicrobiano a ambas concentraciones. Las colonias contadas en caldo tripticasa de soya luego de la incubación por 2 o 24 horas con ácido acético al 2,5% estuvieron 100 veces por debajo que las contadas antes de la incubación, en contraste, las colonias contadas luego de la incubación con ácido acético al 0,25% luego de la incubación por 2 o 24 horas no presentaron gran disminución. Además, la formación de biopelículas se vio interrumpida luego de 1 h de incubación con ácido acético al 2,5%, en el caso del ácido acético al 0,25% se vio interrumpida a las 24 h de ser incubado.

In y colaboradores, en Korea, en el año 2012 evaluaron la actividad de ácidos orgánicos de grado molecular, como el ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico en las cuatro especies distintas de *Shigella* mediante cuatro metodologías: determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en caldo, evaluación de la actividad antimicrobiana al contabilizar las unidades formadoras de colonias (UFC) antes y después de la acción del antimicrobiano, método de difusión en disco e inoculación de lechugas con el microorganismo y evaluación del efecto del desinfectante en las mismas. Las MIC del ácido acético y cítrico a las 24 h de incubación fueron de 0,02 y 0,03% respectivamente en las cuatro especies de *Shigella*; para el ácido láctico en *S. sonnei*, la MIC fue 0,04% y en el

resto de las especies 0,03%. Al evaluar las UFC al sembrar en agar nutritivo en intervalos de 2 h durante 10 h luego de la inoculación con el antimicrobiano, se obtuvo que el ácido láctico a 0,5% inhibe el crecimiento de *Shigella* spp, el ácido cítrico inhibe débilmente el crecimiento de *S. flexneri* e inhibe fuertemente el crecimiento de *S. dysenteriae*, el ácido acético por su parte exhibe la menor actividad antimicrobiana. El ácido acético mostró la mejor actividad antimicrobiana en experimentos con discos de difusión a las 24 h. El ácido láctico mostró la actividad más efectiva cuando se inoculó en la lechuga con 0,5 y 1 min de exposición con el antimicrobiano y el ácido acético generó un mayor daño celular.

En Irak, en el año 2016, Al-Saadi y colaboradores evaluaron el efecto de distintos tipos de vinagre al 5% de ácido acético en 13 aislados de *Streptococcus pyogenes* de pacientes con amigdalitis, utilizaron el método de ensayo en microplacas agregando el vinagre luego de formada la biopelícula. Obtuvieron formación de biopelículas fuertes en 76,9% de los aislados y formación de biopelículas moderadas en un 23%. Todas las cepas disminuyeron la formación de biopelículas a débiles con vinagre de dátil, 12 cepas disminuyeron la formación de biopelículas a débiles con vinagre de manzana y 11 cepas disminuyeron la formación de biopelículas a débiles con vinagre de uva, el resto se mantuvieron como formadoras moderadas.

En el año 2006, en Estados Unidos, Folsom y Frank realizaron un estudio del efecto de la resistencia al cloro de *Listeria monocytogenes* en forma de vida planctónica y su relación con la resistencia en forma de biopelículas. En forma de vida planctónica, luego de 5 min de exposición con el antimicrobiano, de 13 cepas, 9 sobrevivieron a la exposición con cloro al 0,006% pero no a altas concentraciones, 4 sobrevivieron a la exposición con cloro durante 5 min al 0,008%. Hubo formación de biopelículas en 11 de las 13 cepas cuando se incubaron con cloro al 0,006%, pudiéndolas dividir en tres niveles de acuerdo a las UFC

obtenidas. La resistencia a este antimicrobiano en ambas formas de vida no se ve afectada por la densidad celular. Las cepas sensibles al cloro en forma planctónica no fueron las mismas que fueron sensibles en forma de biopelículas. Demostraron que hay al menos dos mecanismos para la resistencia al cloro, ya que de 4 cepas resistentes en forma planctónica, una fue la más resistente y las otras 3 levemente resistentes en forma de biopelículas. Además, no encontró asociación entre la resistencia al cloro con la morfología de la biopelícula formada.

A nivel internacional son diversos los estudios de resistencia a antimicrobianos que se han realizado con *Shigella* spp., sin embargo, no existen casi reportes en cuanto a biopelículas en estas especies.

En Túnez, en el año 2011, Ellafi y colaboradores realizaron estudios con cuatro cepas de *Shigella*, dos pertenecientes a *Shigella sonnei*, una de *Shigella boydii* y otra de *Shigella flexneri*. Se estudió la hidrofobicidad de su pared celular como un factor de virulencia que contribuye a la adherencia a células hospederas, producción de biopelículas en condiciones normales y con falta de nutrientes (condiciones de estrés) y su capacidad de adhesión, evaluando su patogenicidad y colonización en células de carcinoma epidermoide de la cavidad bucal humana. Los resultados mostraron que las células en condiciones de estrés tenían mayor hidrofobicidad y producción de biopelículas de 19% a 34% que aquellas que crecieron en condiciones nutritivas adecuadas, la adherencia a células carcinómicas se vio aumentada de 0,7% a 6,7% luego de un mes de incubación y disminuyó de un 34% a un 11% en condiciones de estrés.

En España. Fariña y colaboradores en el año 2005, a partir de cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de animales domésticos, los cuales presentan reacción cruzada con algunos serotipos somáticos del género *Shigella*, estudiaron sus factores de virulencia como

la adherencia a hidrocarburos, actividad hemolítica, presencia de exopolisacáridos y agregación salina. Observaron que en el 62,5% de las cepas se encontraron los 4 factores de virulencia estudiados y relacionaron estos factores con sus serotipos. Determinaron producción de exopolisacáridos luego de 18 horas de incubación, en 30 de 40 cepas evaluada mediante la metodología de agar rojo congo, indicando la capacidad de formación de biopelículas en ese tiempo.

En Turquía, Gunduz y Tuncel, en el año 2006 evaluaron la producción de biopelículas en una planta de helados, tanto de muestras ambientales como de la línea de producción, tales como el tanque de pasteurización, el tanque de equilibrio, el tanque de envejecimiento, la unidad de alimentación, la cinta transportadora de la máquina de envasado, los desagües y alfombras. Se observó que el número de microorganismos incrementó luego de su limpieza en el tanque de envejecimiento, lo que indica una limpieza ineficiente, por el contrario, en la unidad de alimentación y cinta transportadora disminuyeron luego de su limpieza, sin embargo, no fueron removidos por completo, ya que hubo formación de biopelículas. La limpieza consistió en enjuagues con agua seguidos de un tratamiento alcalino con desinfectantes a 70 °C y un tratamiento ácido a 60°C y enjuague con agua. La mayoría de las bacterias Gram negativas identificadas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, entre ellas: *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Shigella* spp., *Escherichia* spp. y *Edwardsiella* spp., otras Gram negativas incluyeron *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp. y *Alcaligenes* spp. Entre las Gram positivas encontradas estuvieron *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Listeria* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. y *Pediococcus* spp.

### 2.3 Antecedentes nacionales

En el año 1998, Flores y colaboradores realizaron estudios de la susceptibilidad a antibióticos de 36 cepas de *Shigella sonnei* y 21 de *Shigella flexneri*, aisladas de niños con enfermedades diarreicas agudas en Mérida. De 103 muestras fecales de niños, el 55,3% presentaron especies de *Shigella* donde el 63,2% de las cepas pertenecieron a *S. sonnei* y 36,8% a *S. flexneri*. El 70,2% de las cepas fueron resistentes a al menos un antibiótico y el 29,8% fueron susceptibles a todos los antibióticos probados. El 75% de las cepas de *S. sonnei* y 38,1% de *S. flexneri* fueron resistentes a trimetoprima, antibiótico asociado con otros patrones de resistencia, siendo el más común en *S. sonnei* el de sulfametoxazol-estreptomicina con un 63% de resistencia, en *S. flexneri* el patrón de resistencia más común fue el de sulfametoxazol-ampicilina-estreptomicina con un 87,5%. Las resistencias a un solo antibiótico se dieron principalmente en 4 aislados de *S. flexneri* y uno de *S. sonnei* hacia ampicilina. La mayoría de las cepas fueron resistentes a 3 o más antibióticos.

Sandrea y colaboradores en el 2002, procesaron 789 muestras fecales de niños menores de 6 años en Maracaibo, donde el 45,4% de las muestras presentaron bacterias enteropatógenas, el 72,3% correspondieron a especies de *Shigella*, encontrándose *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* y *Shigella dysenteriae* en un 30,5%, 1,5%, 0,8% y 0,8% respectivamente. Se evaluó la resistencia y sensibilidad a 17 antibióticos donde el 92% de las especies fueron multirresistentes (3 a 8 antibióticos). La resistencia para trimetoprima-sulfametoxazol fue de 72,2%, para ampicilina y carbenicilina 64,8%, las cepas de *Shigella dysenteriae* fueron resistentes a los tres antibióticos anteriores. Los aislamientos de *Shigella boydii* fueron resistentes solo a trimetoprima-sulfametoxazol. La resistencia para cefalotina fue de 34,4%, cefamandol 7,3%, cefoperazone 7,3%, ceftazidima 6,2%, ampicilina/sulbactam 1,5%, aztreonam 1,5%, piperacilina 10%, gentamicina 5,4%,

amikacina 5,8% y tetraciclina 28,6%. No se observó resistencia para cloranfenicol, ácido nalidíxico, colimicina y netilmicina.

En el año 2005, Albarado y colaboradores analizaron cepas de *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. en niños menores de 6 años con enfermedades diarreicas agudas en Cumaná, estado Sucre. A partir de 96 muestras de heces se encontraron 52,08% de casos positivos, de los cuales el 16% correspondieron a *Shigella* spp., siendo *S. sonnei* la más frecuente, con 50%, seguida de *S. boydii* y *S. flexneri* con 25% cada una. *Salmonella* spp. se identificó en el 10% de los aislamientos, donde *Salmonella agona* y *Salmonella enteritidis* representaron el 40% y *Salmonella infantis* el 20%. *Shigella* spp. presentó 100% de sensibilidad a ciprofloxacina y gentamicina, 62,50% de resistencia para ampicilina y 12,50% para cloranfenicol, en el caso de *Salmonella* spp. presentó un 100% de sensibilidad a cloranfenicol y 20% de resistencia para ampicilina, ciprofloxacina y gentamicina.

A nivel nacional no hay estudios reportados en cuanto a la formación de biopelículas en especies de *Shigella* spp., sin embargo existen trabajos como los de Puma en el 2015 en Caracas, que evaluó y comparó el fenotipo de resistencia de cepas de *Acinetobacter baumannii* a los antibióticos amikacina y tetraciclina, creciendo en forma libre y formando biopelículas mediante la metodología de ensayo en placas de Elisa, evaluó muestras provenientes de pacientes y del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital Universitario de Caracas. De 30 cepas analizadas creciendo en forma libre, fueron resistentes a amikacina 21, 13 y 8 cepas y a tetraciclina 22, 20 y 12 cepas a las concentraciones de 15 µg/mL, 30µg/mL, 60 µg/mL respectivamente. Formando biopelículas todas las cepas fueron resistentes a amikacina y tetraciclina a las concentraciones de 15 µg/mL, 30µg/mL, 60 µg/mL y 120 µg/mL.

Tampoco existen reportes en Venezuela sobre la resistencia a otros tipos de antimicrobianos como los desinfectantes en especies de *Shigella* spp. pero existen estudios realizados en especies relacionadas como el de Gómez en el 2013, realizado en Caracas, donde evaluó el efecto de dos biocidas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones en el tracto urinario. Determinó el fenotipo de resistencia a compuestos de amonio cuaternario y cloro y estimó la presencia de genes que codifican para bombas de eflujo como las posibles responsables de tal fenotipo de resistencia. Utilizó las metodologías de rapidez de muerte celular y suspensión cuantitativa para determinar los fenotipos de resistencia y la técnica de PCR para evaluar la presencia de los genes codificadores para las bombas de eflujo. En 1 de las 16 cepas estudiadas obtuvo resistencia al compuesto de amonio cuaternario diluido al 10%, 3 crecieron luego de la exposición al desinfectante pudiendo ser persistentes y 12 fueron sensibles; con el cloro resultaron ser sensibles a las diluciones de 5% y 10% correspondiendo a concentraciones de 0,175% y 0,35% de hipoclorito de sodio. Obtuvo resultado positivo para un gen que codifica para bombas de eflujo, sugiriendo que este gen sea el responsable la resistencia al agente ensayado.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana constituye un gran problema de salud pública, ya que limita las posibilidades de utilizar antibióticos efectivos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por los microorganismos, además de evitarlas mediante el uso de otros tipos de antimicrobianos que sean capaces de interrumpir con su ciclo epidemiológico.

La mayoría de los estudios realizados en cuanto a la evaluación de distintos agentes antimicrobianos, se han realizado en bacterias creciendo en forma planctónica o de vida libre. Sin embargo, es necesario conocer el efecto de dichos agentes en el estilo de vida natural de los microorganismos en el ambiente, siendo ésta en el formato de biopelículas, ya que les provee de las condiciones adecuadas para su sobrevivencia y proliferación.

Las bacterias pertenecientes al género *Shigella* son de gran importancia en la salud pública, ya que constituyen la principal causa de disentería a nivel mundial, por lo que ha sido necesario estudiar el efecto de diversos agentes antimicrobianos como los antibióticos contra este agente patógeno. En Venezuela, son muy pocos los estudios de este género bacteriano en relación a la evaluación de su resistencia ante otros agentes antimicrobianos como los desinfectantes, además de los estudios donde se evalúa la formación de biopelículas y el efecto de diversos antimicrobianos ante esta forma de vida.

Por estas razones se ha propuesto este trabajo, esperando sea un aporte para el país en cuanto a los estudios realizados en aislados de *Shigella* spp. provenientes de alimentos, siendo este el medio por el cual comúnmente se adquieren infecciones por este microorganismo, así como en aislados de pacientes con enfermedades diarreicas; a los cuales se les evaluó el fenotipo de resistencia ante distintos antibióticos de uso en clínica para el tratamiento de estas enfermedades y a desinfectantes comúnmente usados a nivel doméstico e incluso industrial; además de generar información sobre la respuesta de las cepas en ambos formatos de vida.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

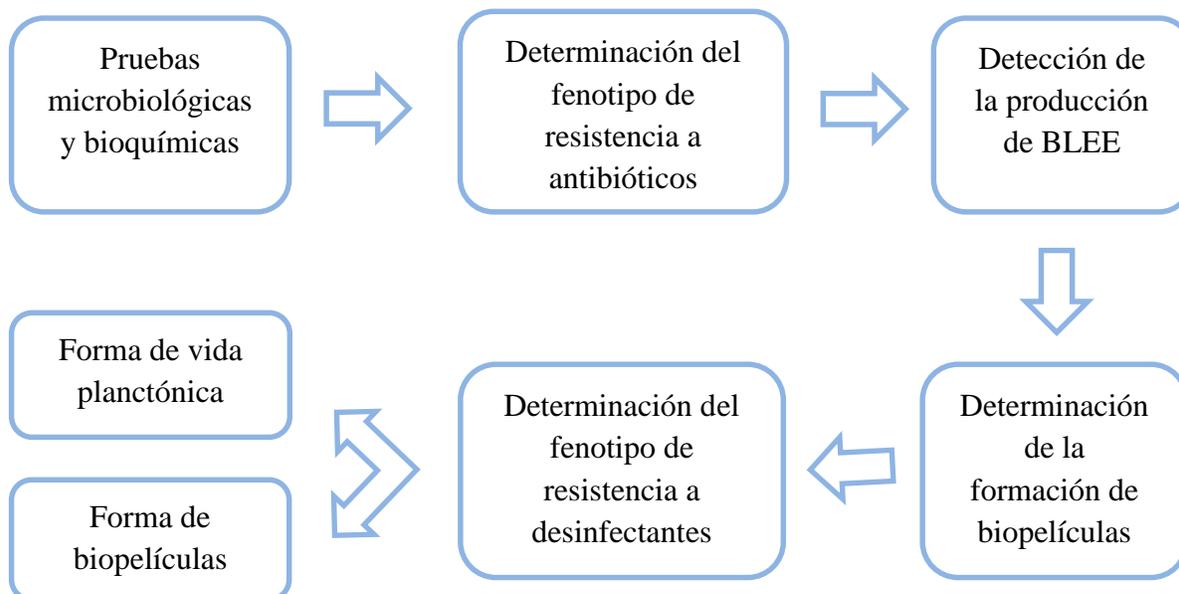
Caracterizar y evaluar microbiológicamente el fenotipo de resistencia y la capacidad de formar biopelículas de aislados de *Shigella* spp.

### 4.2 Objetivos específicos

- Identificar microbiológicamente aislados de *Shigella* spp. de origen clínico y alimentario.
- Evaluar la resistencia de los aislados de *Shigella* spp. a distintos antimicrobianos mediante el método de difusión en disco.
- Evaluar con la prueba de sinergismo de doble disco la presencia de betalactamasas de espectro extendido en los aislados de *Shigella* spp.
- Evaluar la capacidad de formación de biopelículas en aislados de *Shigella* spp.
- Evaluar el efecto del cloro y ácido acético en aislados de *Shigella* spp creciendo en forma planctónica.
- Evaluar el efecto del cloro y ácido acético sobre la formación de biopelículas de aislados de *Shigella* spp.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Metodología general



### 5.2 Materiales

#### 5.2.1 Reactivos

Entre los reactivos utilizados se destacan: cristal-violeta, safranina y lugol (yodo, yoduro de potasio siulterio y agua) en la prueba de tinción Gram. En la realización de las pruebas bioquímicas se emplearon: peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en la prueba de catalasa, el reactivo de Kovacs (alcohol isoamilo,  $p$ -dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado) en el revelado de la prueba de SIM, el  $p$ -dimetilaminobenzaldehído usado en la prueba de la oxidasa y los reactivos A y B (0,5%  $\alpha$ -naftilamina, 0,8% ácido sulfanílico) y zinc en el revelado de la prueba de reducción de nitratos a nitritos o gas nitrógeno libre. Para la determinación de formación de biopelículas se empleó rojo congo (0,025%) en el método de siembra en agar rojo congo y cristal-violeta (0,01%) y etanol (95%) en el método de ensayo en microplacas.

### 5.2.2 Medios de cultivo

Se utilizó agar nutritivo de Merck (pluripeptona 5 g/L, extracto de carne 3 g/L, cloruro de sodio 8 g/L y agar 15 g/L) y caldo nutritivo de Oxoid (pluripeptona 5 g/L, extracto de carne 3 g/L y cloruro de sodio 8 g/L) para el crecimiento y aislamiento de microorganismos, agar MacConkey de Difco (peptona 17 g/L, pluripeptona 3 g/L, lactosa 10 g/L, sales biliares 1,5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, agar 13,5 g/L, rojo neutro 0,03 g/L y cristal violeta 0,001 g/L) para seleccionar bacterias Gram negativas e identificar las colonias no fermentadoras de lactosa. Para la realización de las pruebas bioquímicas se utilizaron los medios de Kligler de HiMedia (peptona de carne 13 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, lactosa 10 g/L, tripteina 10 g/L, glucosa 1 g/L, citrato de hierro y amonio 0,5 g/L, tiosulfato de sodio 0,3 g/L, rojo de fenol 0,025 g/L y agar 15 g/L), Simmons citrato de Oxoid (citrato de sodio 2 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, fosfato dipotásico 1 g/L, fosfato monoamónico 1 g/L, sulfato de magnesio 0,2 g/L, azul de bromotimol 0,08 g/L y agar 15 g/L), SIM de Oxoid (tripteina 20 g/L, peptona 6,1 g/L, sulfato de hierro y amonio 0,2 g/L, tiosulfato de sodio 0,2 g/L y agar 3,5 g/L), urea preparado con agar nutritivo de Difco suplementado con urea de BDH Laboratory, nitrato de Difco (peptona 5 g/L, extracto de carne 3 g/L y nitrato de potasio 1 g/L), esculina preparado con caldo nutritivo de Difco suplementado con esculina de Sigma y oxidación fermentación (O.F) de Difco (tripteina 2 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, fosfato dipotásico 0,3 g/L azul de bromotimol 0,03 g/L y agar 2,5 g/L) suplementado con manitol de HiMedia. Para la evaluación del fenotipo de resistencia a antibióticos se utilizó el agar Müeller-Hinton de Oxoid (infusión de carne 300 g/L, peptona ácida de caseína 17,5 g/L, almidón 1,5 g/L, agar 15 g/L) recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

### 5.2.3 Antimicrobianos y neutralizante

Los antibióticos utilizados en la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer se muestran en la siguiente tabla con sus respectivas concentraciones:

**Tabla IV.** Discos de antibióticos, clasificación y concentraciones de uso evaluados en la determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos mediante la técnica de difusión en disco.

<b>Antibiótico</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g}</math>)</b>
Amoxicilina/ácido clavulánico	Penicilinas ( $\beta$ -lactámico)	30( 20/10)
Ampicilina		10
Cefoxitina	Cefalosporinas ( $\beta$ -lactámicos)	30
Ceftazidima		30
Cefotaxima		25
Ceftriaxona		30
Imipenem	Carbapenémico ( $\beta$ -lactámicos)	10
Estreptomicina	Aminoglucósidos	10
Amikacina		30
Kanamicina		30
Tetraciclina	Tetraciclina	30
Trimetoprim/sulfametoxazol	Nucleosídico/sulfonamida	25 (1,25/23,75)

Los desinfectantes evaluados son cloro y vinagre, cuyos productos son comercializados en los mercados venezolanos. A continuación se muestra respectivamente su compuesto activo y la concentración del mismo (tabla V):

**Tabla V.** Concentraciones del compuesto activo de los productos comerciales empleados como biocidas (cloro y vinagre), concentraciones del producto y de su compuesto activo utilizadas en las evaluaciones del fenotipo de resistencia a biocidas.

Compuesto activo	Concentración del compuesto activo en el producto comercial (%)	Concentración evaluada del producto comercial (%)	Concentración del compuesto activo (%)
Hipoclorito de sodio	3,5	0,5	0,018
		1	0,035
		1,5	0,052
		2	0,07
		5	0,18
		10	0,35
Ácido acético	5	2	0,1
		5	0,25
		15	0,75
		20	1
		30	1,5
		40	2
		50	2,5
		60	3
		75	3,75
		100	5

Como solución neutralizante en las pruebas de determinación del fenotipo de resistencia a desinfectantes en forma planctónica se empleó el caldo Lethen de HiMedia (peptona de carne 10 g/L, extracto de carne 5 g/L, lecitina de soya 0,7 g/L y cloruro de sodio 5 g/L), formulado según las preinscripciones de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC).

#### 5.2.4 Material biológico

Se utilizaron 22 cepas de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*, 11 provenientes de alimentos y 11 de pacientes de distintas edades con síndromes diarreicos agudos tomadas en distintos años. Las cepas de alimentos fueron aisladas, purificadas e identificadas previamente mediante baterías bioquímicas y galerías automatizadas API en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) a partir de pechuga de pollo venezolana comprada en dos expendios comerciales de la Ciudad Capital. Las cepas clínicas provienen

de pacientes con síndromes diarreicos de la clínica Leopoldo Aguerrevere identificadas previamente por el centro de salud mediante tarjetas de identificación VITEK.

**Tabla VI.** Nomenclatura y procedencia de las cepas de utilizadas en este estudio.

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Procedencia</b>
<i>Shigella sonnei</i>	PPII2	Alimentos	<i>Shigella flexneri</i>	2902	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PCII3	Alimentos	<i>Shigella sonnei</i>	7876	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PCII4	Alimentos	<i>Shigella sonnei</i>	370	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PCII6	Alimentos	<i>Shigella sonnei</i>	6890	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PPIV2	Alimentos	<i>Shigella flexneri</i>	7889	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PPVI1	Alimentos	<i>Shigella flexneri</i>	5067	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PCVI4	Alimentos	<i>Shigella sonnei</i>	8407	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PPVII1	Alimentos	<i>Shigella sonnei</i>	8808	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PCIX2	Alimentos	<i>Shigella sonnei</i>	8489	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PPXII2	Alimentos	<i>Shigella sonnei</i>	258	Pacientes
<i>Shigella sonnei</i>	PCXII2	Alimentos	<i>Shigella flexneri</i>	202	Pacientes

Como controles positivos de resistencia a antimicrobianos se utilizaron las cepas: LBP-AB4 (*Acinetobacter baumannii*) y N-694 (*Pseudomonas aeruginosa*) caracterizadas en el Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos (LBP) por Chalbaud (2010) con resistencia a múltiples antibióticos; y como controles negativos de resistencia la cepa HB101 con el código CVCM 77 (*Escherichia coli*) la cual presenta solo resistencia a la estreptomicina y la cepa CVCM 126 (*E. coli*) la cual no presenta resistencias reportadas. Como control positivo de producción de BLEE se utilizó la cepa CVCM 1683 (*Klebsiella pneumoniae*) y como control negativo la cepa CVCM 765 (*E. coli*) donadas por el CVCM. Los controles positivos de formación de biopelículas fueron las cepas LBP-AB4 y MPAO1 (*P. aeruginosa*), donada al LBP por un curso de formación biopelículas de la Universidad de Oriente; como controles negativos la cepa HB101 y la cepa J62-2 con el código CVCM 131 (*E. coli*) donada por el CVCM.

## 5.3 Métodos

### 5.3.1 Corroboración microbiológica y bioquímica por pruebas tradicionales de cepas de *Shigella* spp.

#### 5.3.1.1 Corroboración microbiológica

1. **Crecimiento en agar MacConkey:** De un cultivo líquido de 24h fue tomada una asada en condiciones de esterilidad y se sembró por agotamiento en placas de agar MacConkey e incubaron a 37 °C durante 24 horas. Las colonias fermentadoras de lactosa se observan con una coloración rosada-roja, las incapaces de fermentar lactosa se mostraron incoloras.

2. **Tinción Gram:** En un cubreobjetos se fijó por calor una de las colonias de la cepa a evaluar tomada de una placa de 24h. Se agregó en el cubreobjetos cristal violeta, lugol, alcohol:acetona y safranina, se esperó por un minuto antes de agregar cada reactivo, a excepción del alcohol:acetona, se lavó con agua destilada en cada paso. Finalmente se dejó secar y se observó al microscopio óptico con un aumento de 100x utilizando aceite de inmersión. Las bacterias Gram negativas pueden apreciarse con una coloración roja o rosada, las Gram positivas con una coloración violeta.

#### 5.3.1.2 Corroboración bioquímica

Adicionalmente se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas según lo estipulado por MacFaddin (2003) en condiciones de esterilidad, cada medio de cultivo se preparó siguiendo las instrucciones de la casa comercial:

1. **Prueba de Kligler:** Se sembró una colonia de la cepa a evaluar introduciendo la aguja en el taco y estriando a lo largo de la superficie del bisel, se incubó a 37 °C por 24 h. El bisel alcalino/taco ácido (bisel rojo/taco amarillo) indica solamente la fermentación de glucosa por parte del microorganismo; el bisel ácido/taco ácido (bisel amarillo/taco

amarillo), indica la fermentación de glucosa y lactosa; el bisel alcalino/taco alcalino (bisel rojo/taco rojo), indica que el microorganismo es no fermentador de ambos carbohidratos. Se muestra un resultado positivo para la producción de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) en caso de que se observe el medio ennegrecido y una producción de gases si se observan burbujas o ruptura del medio.

**2. Prueba del Citrato:** Se sembró una colonia por agotamiento a lo largo del bisel e incubó a  $37\text{ }^{\circ}C$  por 24 h. Un cambio de coloración de azul a verde en el medio indica la capacidad del microorganismo de utilizar el citrato como única fuente de carbono, resultado positivo; la ausencia de cambios de color en el medio indica un resultado negativo.

**3. Prueba de SIM:** Se sembró una colonia de la cepa por punción profunda en el medio con aguja e incubó a  $37\text{ }^{\circ}C$  por 24 h. La producción de  $H_2S$  por parte del microorganismo se evidencia mediante la coloración negra del medio; la producción del indol se detecta luego de agregar el reactivo de Kovacs, obteniendo un resultado positivo si este adquiere una coloración rosada-roja y un resultado negativo si no se observan cambios de coloración; adicionalmente, la ausencia de turbidez en el medio indica la no motilidad de la cepa de estudio.

**4. Prueba de la Urea:** Se sembró una colonia por agotamiento a lo largo del bisel e incubó por 24 h a  $37\text{ }^{\circ}C$ . Se muestra un resultado positivo si el medio cambia su coloración a rosado rojo, indicando presencia de la enzima ureasa, siendo un resultado negativo si el medio permanece de color ámbar.

**5. Prueba de la Catalasa:** Se colocó una colonia en un portaobjetos y seguidamente se agregó una gota de  $H_2O_2$ . La presencia de burbujas indica un resultado positivo a esta prueba por la presencia de enzimas catalasas, la ausencia indica un resultado negativo.

**6. Prueba de la Oxidasa:** Se agregó una gota del reactivo de Kovacs en papel de filtro y seguidamente una colonia en contacto con el reactivo rayando el papel. El cambio de coloración a púrpura indica un resultado positivo por la presencia de la enzima oxidasa, siendo un resultado negativo si no se observan cambios de coloración del reactivo.

**7. Prueba del Nitrato:** Se sembró con una aguja en el medio e incubó por 24 h a 37 °C. Se observa un resultado positivo a esta prueba si ocurre un cambio de color rosado-rojo luego de agregado los reactivos A y B, lo cual indica la reducción de nitratos a nitritos, en caso de que se observe un resultado negativo se debe agregar zinc, si se observa un cambio de coloración a rosado-rojo quiere decir que los nitratos en el medio, por el contrario, si no se observan cambios significa que el microorganismo ha liberado nitrógeno molecular.

**8. Prueba de la Esculina:** Se inoculó una colonia en el medio con un asa e incubó a 37 °C por 72 h. Se muestra un resultado positivo si se forma un complejo verde-negro en el medio por la capacidad de hidrólisis de la esculina por parte del microorganismo, si no se observan cambios en el medio indica un resultado negativo.

**9. Prueba de O.F manitol:** Se sembró una colonia con un asa en el medio con aguja e incubó a 37 °C por 72 h en un tubo cerrado con vaselina o parafina (condiciones anaeróbicas) y en un tubo sin sellar (condiciones aeróbicas). Se muestran resultados positivos para la oxidación-fermentación de este carbohidrato al observar un viraje de verde a amarillo en el medio en ambas condiciones, el resultado negativo se evidencia por ausencia de cambios de coloración o un viraje a azul del mismo.

### **5.3.2 Determinación del fenotipo de resistencia a distintos antibióticos mediante el método de difusión en disco en cepas de *Shigella* spp.**

Para determinar el fenotipo de resistencia a antibióticos se empleó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Bauer y col, 1966) siguiendo las recomendaciones del CLSI. En

tubos con 2 mL de solución salina estéril a 0,85% se agregaron en condiciones de esterilidad las colonias necesarias hasta alcanzar el patrón de 0,5 unidades McFarland. Con un hisopo estéril se sembró un césped bacteriano en las placas con agar Müeller-Hinton (grosor de 4-5 mm aproximadamente) rayando en 3 direcciones diferentes. Se colocaron de 4 a 5 discos de antibióticos en cada placa de manera equidistante e incubó en la estufa a 37 °C durante 24 h. Al finalizar el tiempo se midieron los halos de inhibición de crecimiento bacteriano formados, determinando el fenotipo de cada cepa como establece el CLSI.

### **5.3.3 Detección de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) por prueba de sinergismo de doble disco en cepas de *Shigella* spp.**

Para la determinación de la presencia de BLEE, se empleó el método de Jarlier (Padilla, 2011). Siguiendo la misma metodología de difusión en disco de Kirby-Bauer bajo las recomendaciones del CLSI, se colocaron discos de ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona con y sin amoxicilina/ácido clavulánico, este último es un inhibidor de BLEE. El disco de amoxicilina/ácido clavulánico se coloca en el centro de la placa y los tres restantes a distancias de 25 mm de este formando dos ángulos de 90°. El sinergismo observado por la inhibición “efecto huevo” o “cola de pez” de los discos de antibióticos en combinación con el disco de ácido clavulánico indica la presencia de BLEE.

### **5.3.4 Determinación de la formación de biopelículas en cepas de *Shigella* spp.**

Se emplearon dos metodologías diferentes para la determinación de la producción de biopelículas en *Shigella*, estas son:

- 1. Método del agar rojo congo:** En placas de agar nutritivo suplementadas con rojo congo al 0,025%, se sembraron las cepas por agotamiento y se incubó por 24, 48 y 72 h a 37°C. Las colonias de las cepas productoras de exopolisacáridos se observaron rosadas-rojas con producción o no de mucosidad y las no productoras incoloras o blanquecinas

(Martínez y col., 2008). El tiempo de aparición de colonias rosadas-rojas fue el utilizado en el método de ensayo en microplacas.

**2. Método de ensayo en microplacas:** Para evaluar la capacidad de formar biopelículas en las distintas cepas se utilizaron microplacas de Elisa de 96 pozos siguiendo la metodología de Passerini y col. (2007) con algunas consideraciones de Merrit y col. (2005). La cepa de interés es cultivada en caldo nutritivo durante 24 horas a 37°C. Se realizaron diluciones 1/100 de cada cepa y se procedió a sembrar cada cepa por columnas. Se incubó a 37°C durante 72 h, transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados de las microplacas sumergiéndolas en agua destilada, se dejó secar la placa y se agregó 200 µL de cristal-violeta a cada pozo dejando actuar durante 30 min, luego se lavó nuevamente, dejó secar y se agregó 200 µL de etanol al 95% por pozo para fijar las células de la biopelícula a la placa, transcurridos 30 min se generó la lectura de la densidad óptica (DO) a 570 nm en un lector de placas de Elisa Tecan IP 214.

Se midieron las medias de DO de cada cepa y se calculó el punto de corte (DOc), el cual corresponde a tres desviaciones estándar del blanco más la DO media del mismo, considerando a las cepas no formadoras de biopelículas si  $DO \leq DOc$ , formadoras débiles si  $DOc < DO \leq 2DOc$ , formadoras moderadas si  $2DOc < DO \leq 4DOc$  y formadoras fuertes si  $4DOc < DO$  (Passerini y col., 2007 y Gómez y col., 2013).

### **5.3.5 Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas en cepas de *Shigella* spp.**

#### **5.3.5.1 Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas creciendo en forma de vida libre**

Las pruebas realizadas para evaluar el efecto del cloro y ácido acético son las recomendadas por la AOAC (Anon, 1997).

Para los análisis correspondientes se utilizó una colonia aislada para inocular 2 mL de caldo nutritivo en agitación durante 24h. Previamente se realizaron controles de toxicidad y neutralización para comprobar que el neutralizante no es tóxico para las cepas bacterianas y que este detiene la acción del desinfectante evaluado.

En la primera prueba control se tomaron 100  $\mu$ L de suspensión bacteriana de la cepa correspondiente y se transfirieron a 900  $\mu$ L de solución neutralizante, se incubaron a 37 °C durante 24 h y se observó a simple vista si hubo crecimiento bacteriano por la turbidez del medio, la cual indica que la solución neutralizante no es tóxica para las cepas bacterianas.

En la segunda prueba control se mezclaron 100  $\mu$ L de la solución desinfectante con 800  $\mu$ L de neutralizante dejando reposar por 5 min, se añadieron 100  $\mu$ L de una suspensión bacteriana sensible al agente desinfectante y se dejó actuar por 5 min, posteriormente se sembró en agar nutritivo durante 24 h a 37 °C y se observa si hubo crecimiento por la formación de colonias, lo cual indica que el neutralizante detiene el efecto del antimicrobiano en el tiempo ensayado.

Seguidamente, se realizaron los protocolos de rapidez de muerte celular y suspensión cuantitativa. En el primer protocolo se tomó 100  $\mu$ L del cultivo inoculado y se puso en contacto con 900  $\mu$ L del agente antimicrobiano a probar (cloro y vinagre) a las concentraciones de prueba mostradas en la tabla V con un tiempo de exposición de 5 min; se transfirieron 100  $\mu$ L de la mezcla a 900  $\mu$ L de la solución neutralizante y se incubaron las soluciones durante 48 h a 37 °C con agitación. Transcurrido ese tiempo se observó a simple vista si hubo crecimiento bacteriano. En el segundo protocolo se probaron aquellas que fueron resistentes en la primera prueba, se tomaron 100  $\mu$ L del cultivo inoculado y se puso en contacto con 900  $\mu$ L del desinfectante a la concentración de prueba durante 5 min, se transfirieron 100  $\mu$ L de la mezcla a 900  $\mu$ L de la solución neutralizante, se dejó en

reposo por 5 min y se realizaron diluciones seriadas de la mezcla en solución neutralizante desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$ , paralelamente se realizaron diluciones seriadas en solución salina del cultivo puro desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ , las diluciones se sembraron por el método de titulación en gotas en agar nutritivo suplementado con el antibiótico al cual la cepa presentaba resistencia para seleccionarlás, se incubaron las placas por 24 h a 37 °C, se contó el número de unidades formadoras de colonias y calculó el título bacteriano:

$$\text{Título} = \frac{\text{UFC} \times \text{FD}}{\text{V}}$$

UFC= unidades formadoras de colonias, FD= Factor de dilución, V= volumen de siembra.

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

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

Dónde, AD= antes de la acción del desinfectante y DD= después de la acción del desinfectante. Se consideraron sensibles aquellas cepas que presentaron  $\log_{10}RV \geq 5$  a los 5 min de exposición y resistentes las que presentaron  $\log_{10}RV < 5$ , tal como establece el Comité Europeo de Normalización (CEN, 2005).

### **5.3.5.2 Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas creciendo en biopelículas**

Se evaluó el efecto del cloro y el ácido acético sobre las biopelículas formadas mediante el método de ensayo en microplacas siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2 de la sección 5.3.4. A las 72h se realizó un recambio de medio agregando el desinfectante a las distintas concentraciones de prueba: cloro 0,5%; 1%; 1,5% y 2% y vinagre 5%; 15%; 30% y 60%, se incubó por 24h más para realizar los lavados y lectura correspondientes.

#### **5.3.5.2.1 Análisis estadísticos**

Se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías, para determinar si los niveles de dos factores (cepas y tratamientos con distintos antimicrobianos) o la interacción entre

ambos influyen en los valores de una variable dependiente (absorbancia o DO). Este análisis fue realizado con el programa STATISTICA versión 10 con la ayuda y colaboración del licenciado Víctor Hugo Aguilar de la escuela de Geografía de la UCV.

Para poder realizar este análisis estadístico, inicialmente deben cumplirse tres supuestos: distribución normal de los datos, independencia de los datos y la forma en cómo se distribuye la varianza de los datos en cuanto a los errores típicos y homogeneidad de datos (homocedasticidad).

Las hipótesis nulas ( $H_0$ ) planteadas fueron:

- Igualdad de medias de la DO de las cepas con los tratamientos con antimicrobianos aplicados.
- Igualdad de media de las DO de las cepas.

Es decir, no hay efecto de los biocidas sobre la formación de biopelículas formadas en cada cepa, determinada por la DO medida.

Siendo las hipótesis alternativas ( $H_1$ ):

- Desigualdad de las medias de la DO de las cepas con los tratamientos con antimicrobianos aplicados.
- Desigualdad de las media de las DO de las cepas.

El valor para el cual puede asumirse que existen efectos diferenciales entre los niveles de los factores dependerá del valor de las tablas estadísticas de la distribución F de Fisher Snedecor para un intervalo de confianza de al menos 5%. Si el valor calculado es mayor al nivel de significancia  $p$  indica que sí hay efectos entre los grupos y por lo tanto se acepta la hipótesis de dependencia entre las variables (Vicéns y col., 2005), por lo tanto, si  $p \leq 0,05$  se rechaza la hipótesis nula, su  $p > 0,05$  se supone que la hipótesis nula es cierta.

## 6. RESULTADOS

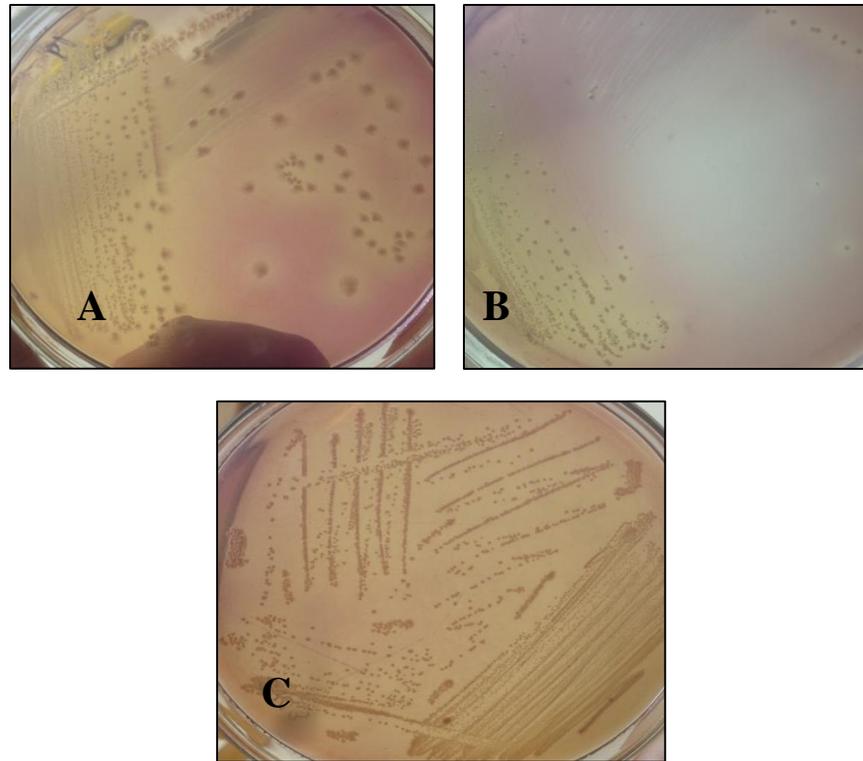
### 6.1 Corroboración microbiológica y bioquímica por pruebas tradicionales de cepas de *Shigella* spp.

Con el objetivo de corroborar la identificación de las cepas de estudio aisladas a partir de pechuga de pollo y pacientes con enfermedades diarreicas, se realizaron las pruebas microbiológicas y bioquímicas correspondientes.

Las 22 cepas de *Shigella* spp. evaluadas corresponden a bacilos Gram negativos según las pruebas de tinción Gram realizadas. Además, presentaron crecimiento en agar MacConkey, por lo que corresponden a bacterias Gram negativas, siendo clasificadas como no fermentadores de lactosa ya que las colonias formadas resultaron ser incoloras, ambos resultados se observan en las figuras 3 y 4.



**Figura 3.** Registro fotográfico de las pruebas de tinción Gram realizadas a cepas de *Shigella* spp. observadas al microscopio óptico con objetivo de 100x. A: Cepa PCXII2, *Shigella sonnei* proveniente de alimentos; B: Cepa 202, *Shigella flexneri* proveniente de pacientes; C: Cepa 7876, *Shigella sonnei* proveniente de pacientes.



**Figura 4.** Resultados del crecimiento bacteriano en cepas de *Shigella* spp. en agar MacConkey. A: Cepa PCVI4, *Shigella sonnei* proveniente de alimentos; B: Cepa 5067 *Shigella flexneri* proveniente de pacientes; C: Cepa 258, *Shigella sonnei* proveniente de pacientes.

En la prueba de Kligler se obtuvo un resultado positivo para la fermentación de glucosa y negativos para la fermentación de lactosa, producción de H<sub>2</sub>S y gas, adicionalmente se obtuvieron resultados positivos para la prueba de catalasa que es una oxidoreductasa contenida en aerobios y anaerobios facultativos, la cual cataliza la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, positivo para nitrato, por lo que puede reducir nitratos a nitritos y positivo para O.F manitol, pudiendo oxidar y fermentar dicho carbohidrato. Se mostraron resultados negativos para las pruebas del citrato, SIM, urea, oxidasa y esculina, por lo que este microorganismo no es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono desdoblándolo a oxalacelato y acetato (por la enzima citritasa), no genera triptófano a partir

del indol, es no móvil, no presenta las enzimas ureasa que desdobla la urea en amoníaco, no presenta la enzima oxidasa y no hidroliza la esculina en esculetina y glucosa. Estos resultados concuerdan con los que deben obtenerse este grupo bacteriano., según MacFaddin (2003) y pueden observarse en la tabla VII.

**Tabla VII.** Resultados de las pruebas microbiológicas y bioquímicas en todas las cepas analizadas de *Shigella* spp.

Prueba		Resultado
Tinción Gram		GN
MacConkey		GN/Lac <sup>-</sup>
Kligler	Glucosa	+
	Lactosa	-
Citrato		-
SIM	Motilidad	-
	Indol	-
	H <sub>2</sub> S	-
Urea		-
Catalasa		+
Oxidasa		-
Nitrato		+
Esculina		-
O.F manitol	Aeróbico	+
	Anaeróbico	+

GN: Gram negativa, +: Positivo, -: Negativo

## 6.2 Determinación del fenotipo de resistencia a distintos antibióticos mediante el método de difusión en disco en cepas de *Shigella* spp.

Para evaluar el fenotipo de resistencia a los antibióticos ensayados (tabla IV) se empleó la metodología de difusión en disco de Kirby-Bauer, la medida del halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del disco fue utilizada para clasificar a la cepa como sensible o resistente al antibiótico según los parámetros establecidos por el CLSI. A continuación se muestra el resultado obtenido en una de las cepas analizadas para cinco de

los antibióticos evaluados, donde se muestran los halos de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de los discos de antibiótico (figura 5):



**Figura 5.** Fotografía del resultado de los antibiogramas generados para la cepa 370 *Shigella sonnei* proveniente de pacientes, mediante la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer. 1: Disco de kanamicina; 2: Disco de imipenem, 3: Disco de amoxicilina/ácido clavulánico, 4: Disco de amikacina, 5: Disco de trimetoprim-sulfametoxazol. Resistente a trimetoprim-sulfametoxazol y sensible a kanamicina, imipenem, amoxicilina/ácido clavulánico y amikacina.

Los resultados de los fenotipos obtenidos se muestran en la tabla VIII, los controles de resistencia obtuvieron resistencia múltiple a los antibióticos evaluados y los sensibles lo fueron a la totalidad de los antibióticos, a excepción de la cepa HB101, la cual presenta resistencia a la estreptomina de acuerdo a lo reportado en los catálogos del CVCM, concordando con el fenotipo del microorganismo.

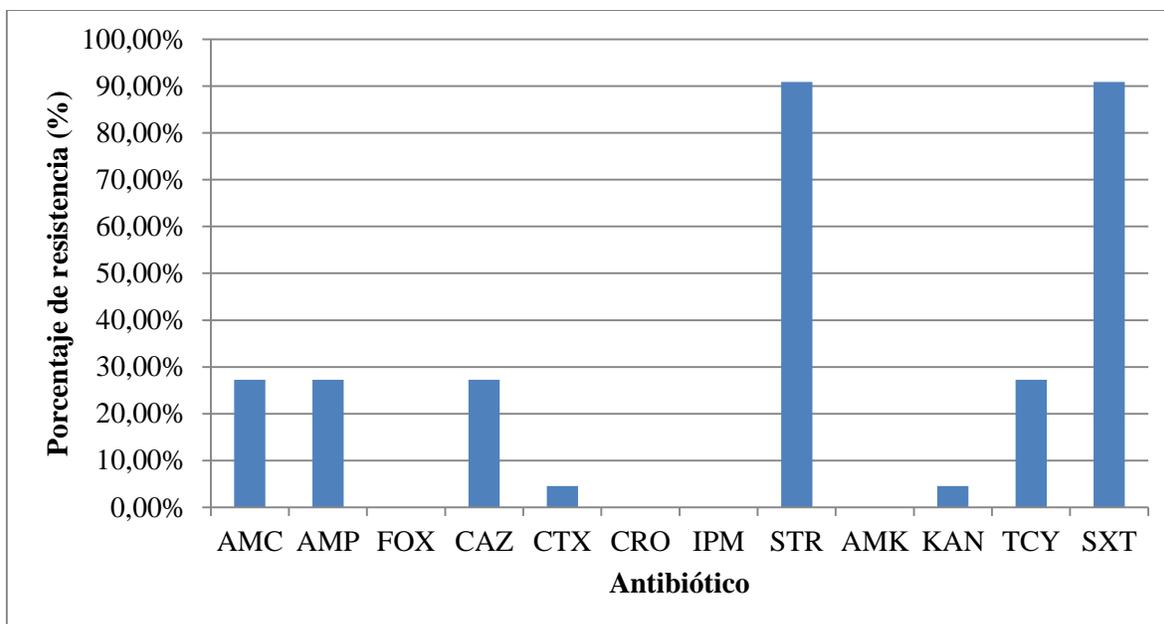
**Tabla VIII.** Resultado de los fenotipos de resistencia de las cepas de *Shigella* spp. obtenidos mediante el método de difusión en disco.

Cepa	AMC	AMP	FOX	CAZ	CTX	CRO	IPM	STR	AMK	KAN	TCY	SXT
LBP-AB4	R	R	NP	S	I	R	R	NP	S	NP	I	S
N-694	R	R	R	S	NP	R	S	R	S	NP	NP	R
126	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
HB101	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
PPII2	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	R
PCII3	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
PCII4	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
PCII6	R	R	S	R	S	S	S	R	S	I	R	R
PPIV2	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
PPVI1	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
PCVI4	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
PPVIII1	S	S	S	R	S	S	S	R	S	I	S	R
PCIX2	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
PPXII2	S	S	S	R	I	S	S	R	S	S	S	S
PCXII2	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R
2902	R	R	S	R	S	S	S	R	S	I	R	R
7876	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
370	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
6890	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
7889	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
5067	R	R	S	R	S	S	S	R	S	I	R	R
8407	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
8808	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R
8489	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
258	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
202	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R

AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico, AMP: Ampicilina, FOX: Cefoxitina, CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, IMP: Imipenem, STR: Estreptomicina, AMK: Amikacina, KAN: Kanamicina, TCY: Tetraciclina, SXT: trimetoprin sulfametoxazol. R: Resistente, I: Intermedio, S: Sensible, NP: No probado.

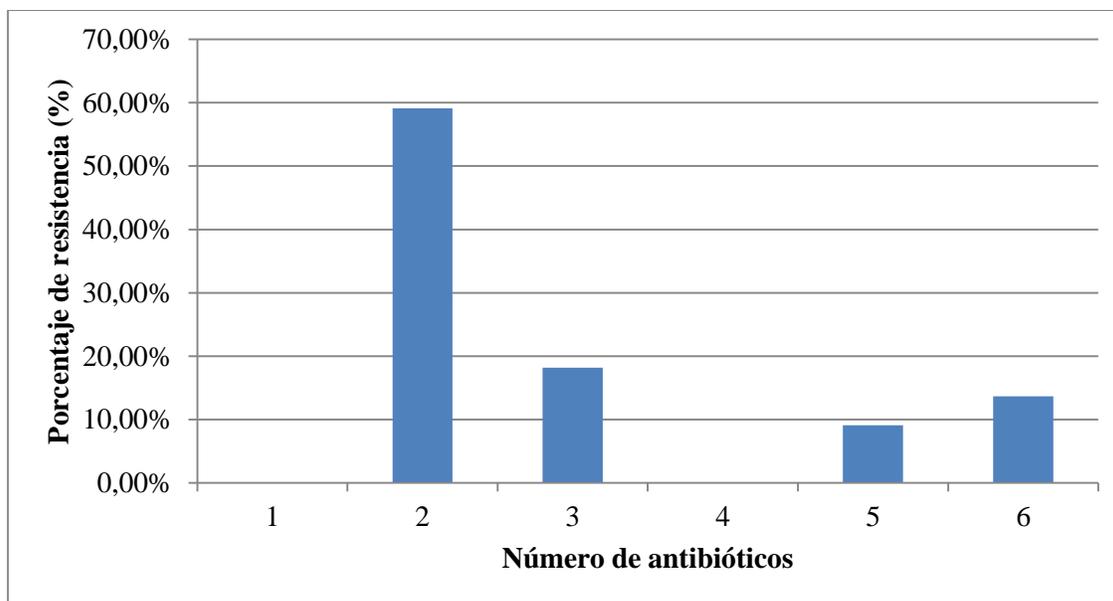
En la figura 6 se muestran los porcentajes de resistencia para cada uno de los antibióticos ensayados, donde se encontraron 20 (90,91%) cepas resistentes a STR y a SXT, 6 (27,27%) cepas resistentes a AMC, AMP, CAZ y TCY y una (4,54%) cepa resistente a CTX y KAN.

No hubo cepas resistentes a FOX, CRO, IMP ni a AMK.



**Figura 6.** Porcentajes de resistencia obtenidos para cada antibiótico en las cepas de *Shigella* spp. evaluadas. AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico, AMP: Ampicilina, FOX: Cefoxitina, CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, IMP: Imipenem, STR: Estreptomina, AMK: Amikacina, KAN: Kanamicina, TCY: Tetraciclina, SXT: trimetoprin sulfametoxazol.

En la figura 7, se muestran los porcentajes de cepas resistentes a uno, dos, tres, cuatro, cinco y seis antibióticos, donde 13 cepas (59,09%), presentaron resistencia a dos antibióticos, 8 de alimentos (PPII2, PCII3, PCII4, PPIV2, PPVI1, PCVI4, PCIX2 y PPXII2) y 5 de pacientes (7876, 370, 6890, 8407 y 8489); 4 cepas (18,18%) presentaron resistencia a tres antibióticos, 2 de alimentos (PPVIII1 y PCXII2) y 2 de pacientes (258 y 202); 2 cepas (9,09%) presentaron resistencia a cinco antibióticos, ambas de pacientes (7889 y 8808) y 3 (13,64%) presentaron resistencia a seis antibióticos, 1 de alimentos (PCII6) y 2 de pacientes (2902 y 5067).



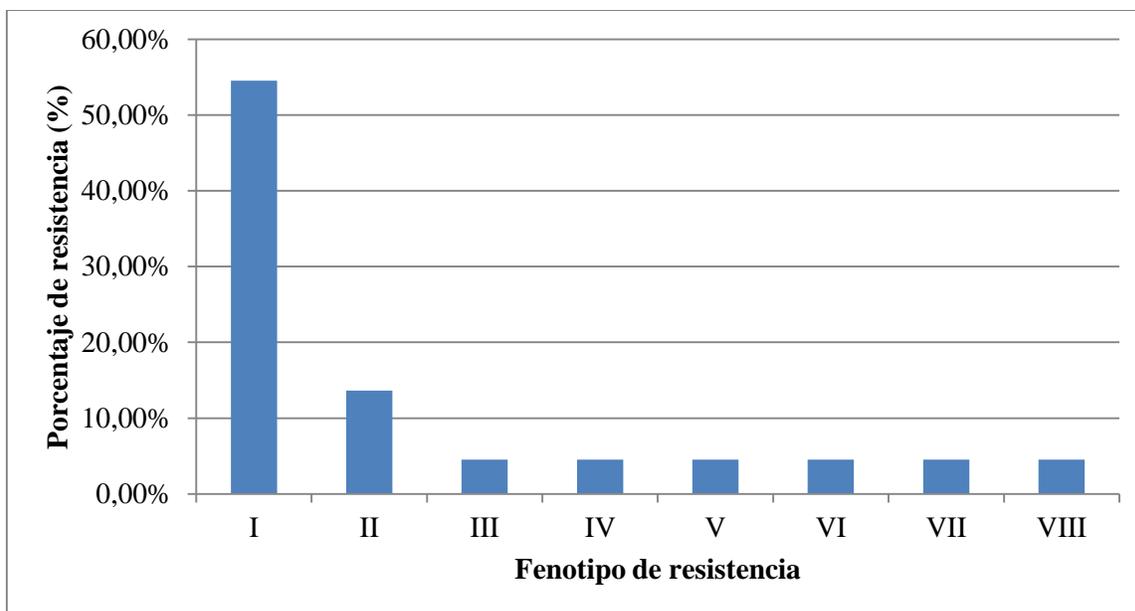
**Figura 7.** Porcentajes de las cepas resistentes de *Shigella* spp. a uno o más antibióticos.

Tal como es mostrado en la tabla IX y figura 8, los perfiles de resistencia obtenidos para las 22 cepas evaluadas fueron agrupados por fenotipos del I al IX, de los cuales 12 cepas (54,54%) presentaron el fenotipo I, siendo 7 de alimentos (PPII2, PCII3, PCII4, PPIV2, PPVII1, PCVI4 y PCIX2) y 5 de pacientes (7876, 370, 8407, 8489 y 6890) 3 cepas (13,64%) presentaron el fenotipo II, siendo 1 de alimentos (PCII6) y 2 de pacientes (2902 y 5067) de los fenotipos III, IV, V, VI, VII, VIII y IX fueron presentados por una cepa cada uno (4,54%) siendo las cepas PPVIII1, PPXII2, PCXII2 (de alimentos) 7889, 8808, 258 y 202 (de pacientes) respectivamente.

**Tabla IX.** Perfiles y fenotipos de resistencia de las cepas de *Shigella* spp. obtenidos mediante el método de difusión en disco.

<b>Cepa</b>	<b>Perfil de resistencia</b>	<b>Fenotipo</b>
<b>PPII2</b>	STR, SXT	I
<b>PCII3</b>	STR, SXT	I
<b>PCII4</b>	STR, SXT	I
<b>PCII6</b>	AMC, AMP, CAZ, STR, TCY, SXT	II
<b>PPIV2</b>	STR, SXT	I
<b>PPVI1</b>	STR, SXT	I
<b>PCVI4</b>	STR, SXT	I
<b>PPVII1</b>	CAZ, STR, SXT	III
<b>PCIX2</b>	STR, SXT	I
<b>PPXII2</b>	CAZ, STR	IV
<b>PCXII2</b>	STR, KAN, SXT	V
<b>2902</b>	AMC, AMP, CAZ, STR, TCY, SXT	II
<b>7876</b>	STR, SXT	I
<b>370</b>	STR, SXT	I
<b>6890</b>	STR, SXT	I
<b>7889</b>	AMC, AMP, STR, TCY, SXT	VI
<b>5067</b>	AMC, AMP, CAZ, STR, TCY, SXT	II
<b>8407</b>	STR, SXT	I
<b>8808</b>	AMP, CAZ, CTX, STR, SXT	VII
<b>8489</b>	STR, SXT	I
<b>258</b>	AMC, AMP, TCY	VIII
<b>202</b>	AMC, TCY, SXT	IX

AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico, AMP: Ampicilina, FOX: Cefoxitina, CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, IMP: Imipenem, STR: Estreptomicina, AMK: Amikacina, KAN: Kanamicina, TCY: Tetraciclina, SXT: trimetoprin sulfametoxazol.

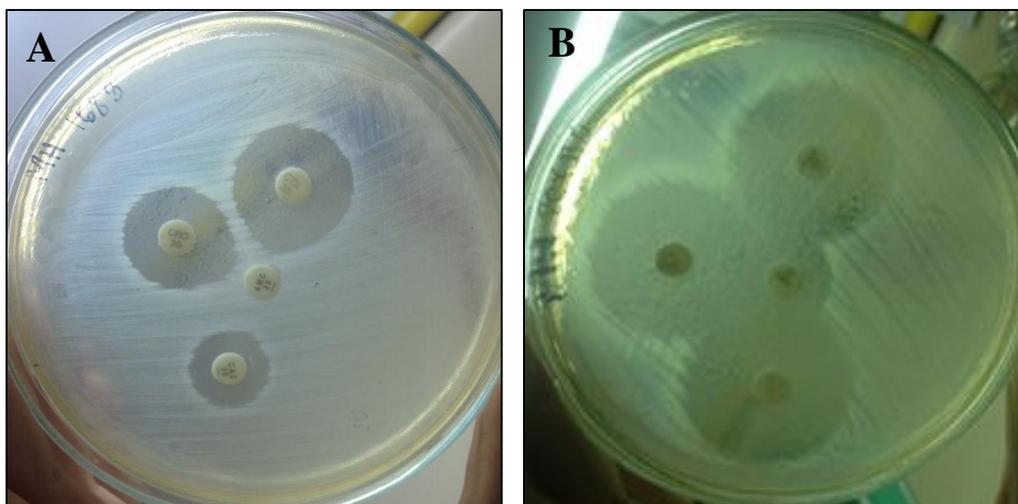


**Figura 8.** Porcentajes de aparición de los distintos fenotipos de resistencia obtenidos para las cepas de *Shigella* spp. evaluadas. I: CAZ, STR; II: STR, STX; III: CAZ, STR, STX; IV: AMC, AMP, CAZ, STR, TCY, STX; V: STR, KAN, STX; VI: AMP, CAZ, CTX, STR, SXT; VII: AMC, AMP, TCY; VIII: AMC, TCY, STX.

### 6.3 Detección de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) por prueba de sinergismo de doble disco en cepas de *Shigella* spp.

Con la finalidad de evaluar la presencia de enzimas BLEE, se empleó el método de Jarlier utilizando los discos de ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona con y sin el inhibidor de los antibióticos, amoxicilina/ácido clavulánico. La visualización del sinergismo indica la presencia de BLEE. El control positivo, la cepa 1686, *Klebsiella pneumoniae* presenta el “efecto huevo”, indicando la producción de BLEE por este microorganismo (figura 9). En ninguna de las cepas analizadas se observó el “efecto huevo” o “cola de pez” de los discos de antibióticos en combinación con el disco de ácido clavulánico por lo que estas cepas no presentan un perfil fenotípico sugestivo para la presencia de dichas enzimas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para los perfiles de resistencia a los betalactámicos

donde muy pocas cepas resultaron ser resistentes a ampicilina y ceftazidima, siendo sensibles a los demás betalactámicos.



**Figura 9.** Fotografía de resultados de la prueba de sinergismo de doble disco para el control positivo y una cepa de *Shigella* spp. evaluada. A: Control positivo de producción de BLEE, 1686 (*Klebsiella pneumoniae*), B: Cepa PCXII2 *Shigella sonnei* proveniente de alimentos.

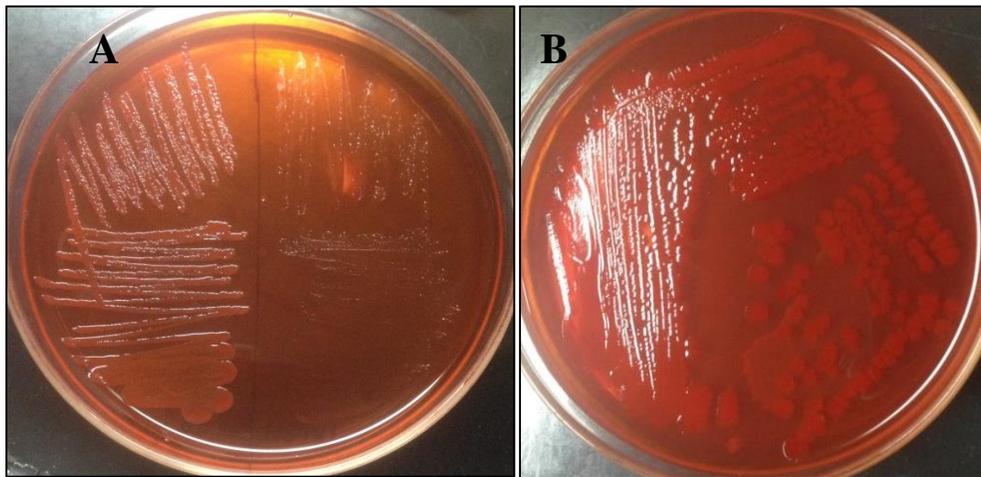
#### **6.4 Determinación de la formación de biopelículas en cepas de *Shigella* spp.**

Con el fin de determinar la formación de biopelículas en las cepas de *Shigella* spp, se empleó el método del agar rojo congo, determinando cualitativamente la formación de biopelículas por la producción de exopolisacáridos; seguidamente, se realizó el método de ensayo en placas de poliestireno, el cual permite clasificar el tipo de biopelícula formada.

##### **6.4.1 Método del agar rojo congo**

Se determinó la formación de biopelículas mediante la metodología del agar rojo congo a las 24, 48 y 72 horas, observando la coloración de las colonias formadas. La coloración roja de las mismas indica secreción de exopolisacáridos por parte de los microorganismos presentes, dicho componente es esencial en la formación de biopelículas, por lo que el tiempo en el cual se logró observar la coloración roja en la mayoría de las cepas fue el

empleado en el siguiente ensayo de formación de biopelículas en microplacas, siendo a las 72 h, donde la totalidad de las cepas presentaron dicha coloración, sin embargo, 2 cepas, 1 de alimentos y 1 de pacientes (PPII2 y 8407 respectivamente) presentaron la coloración roja a las 24 h y 2 más de pacientes (258 y 208) la presentaron a partir de las 48 h. Los controles positivos LBP-AB4 y MPAO1 producen colonias mucoides color rojo intenso a partir de las 24 h, en el caso de los controles negativo HB101 y J62-2 presentan colonias incoloras en los tres tiempos evaluados. En la tabla X se muestran los resultados obtenidos mediante esta metodología.



**Figura 10.** Resultados obtenidos de la formación de biopelículas en agar rojo congo. A: Control positivo LBP-AB4 y control negativo HB101; B: Cepa PPVII1, *Shigella sonnei* proveniente de alimentos a las 72 h de incubación.

**Tabla X.** Características de las colonias formadas por las cepas de *Shigella* spp. a los tiempos de incubación 24, 48 y 72 h.

Cepa	24h	48h	72h	Cepa	24h	48h	72h
<b>LBP-AB4</b>	+++	+++	+++	<b>PPXII2</b>	+	+	++
<b>HB101</b>	+	+	+	<b>PCXII2</b>	+	+	+++
<b>MPAO1</b>	+++	+++	+++	<b>2902</b>	+	+	++
<b>J62-2</b>	+	+	+	<b>7876</b>	+	+	+++
<b>PPII2</b>	++	++	+++	<b>370</b>	+	+	++
<b>PCII3</b>	+	+	+++	<b>6890</b>	+	+	+++
<b>PCII4</b>	+	+	++	<b>7889</b>	+	+	++
<b>PCII6</b>	+	+	++	<b>5067</b>	+	+	++
<b>PPIV2</b>	+	+	+++	<b>8407</b>	++	++	+++
<b>PPVII1</b>	+	+	+++	<b>8808</b>	+	+	+++
<b>PCVI4</b>	+	+	++	<b>8489</b>	+	+	++
<b>PPVIII1</b>	+	+	++	<b>258</b>	+	++	+++
<b>PCIX2</b>	+	+	++	<b>202</b>	+	++	+++

+: Colonias transparentes, ++: Colonias rojo claro sin moco, +++: Colonias mucoides rojo intenso.

#### 6.4.2 Método de ensayo en microplacas

Para el ensayo se decidió evaluar la producción de la biopelícula tras las 72 h de incubación puesto a que los resultados cualitativos en agar rojo congo sugieren la producción de EPS en ese tiempo de crecimiento. El control positivo LBP-AB4 produce biopelículas fuertes, en el caso del control negativo HB101, forma biopelículas débiles; adicionalmente se utilizaron dos controles más, la cepa MPAO1, la cual forma biopelículas fuertes y es una cepa de referencia en estos ensayos de producción de biopelículas y la J62-2 que forma biopelículas débiles.

De las 22 cepas evaluadas, forman biopelículas 21 de ellas (95,45%), 11 cepas provenientes de alimentos y 10 de pacientes, sólo una es no formadora (4,54%), la cual proviene de pacientes (7889). En cuanto a la clasificación del tipo de biopelículas formadas bajo las condiciones ensayadas, una resultó ser formadora fuerte (4,54%), proveniente de alimentos (PPIV2), 11 moderadas (50%), siendo 6 de alimentos (PPII2, PCII3, PCII4, PCII6, PCVI4

y PPXII2) y 5 de pacientes (7876, 5067, 8407, 8808, y 8489) y 9 son formadoras débiles (40,9%), de las cuales 4 provienen de alimentos (PPVII1, PPVIII1, PCIX2 y PCXII2) y 5 de pacientes (2902, 370, 6890, 258 y 202).

**Tabla XI.** Clasificación de las biopelículas formadas por las cepas de *Shigella* spp.

Cepa	Clasificación	Cepa	Clasificación
<b>LBP-AB4</b>	FF	<b>PPXII2</b>	FM
<b>HB101</b>	FD	<b>PCXII2</b>	FD
<b>MPAO1</b>	FF	<b>2902</b>	FD
<b>J6-22</b>	FD	<b>7876</b>	FM
<b>PPII2</b>	FM	<b>370</b>	FD
<b>PCII3</b>	FM	<b>6890</b>	FD
<b>PCII4</b>	FM	<b>7889</b>	NF
<b>PCII6</b>	FM	<b>5067</b>	FM
<b>PPIV2</b>	FF	<b>8407</b>	FM
<b>PPVII1</b>	FD	<b>8808</b>	FM
<b>PCVI4</b>	FM	<b>8489</b>	FM
<b>PPVIII1</b>	FD	<b>258</b>	FD
<b>PCIX2</b>	FD	<b>202</b>	FD

FF: Formadora de biopelículas fuertes, FM: Formadora de biopelículas moderadas, FD: Formadora de biopelículas débiles, NF: No formadora de biopelículas.

### 6.5 Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas en cepas de *Shigella* spp.

Se realizaron las pruebas fenotípicas de resistencia a biocidas en los dos tipos de forma de vida bacteriana, planctónica y biopelículas. En este estudio se utilizaron dos desinfectantes a distintas concentraciones, el cloro, usado en el área clínica y doméstica y el ácido acético usado en la industria alimentaria y en el área doméstica bajo la presentación del vinagre; ambos productos utilizados son de marcas nacionales, distribuidos en los comercios del Distrito Capital.

### **6.5.1 Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas creciendo en forma de vida libre**

Con el fin de evaluar el fenotipo de resistencia de las cepas de *Shigella* spp. se realizaron dos pruebas: la de rapidez de muerte celular donde se determina cualitativamente la resistencia al agente antimicrobiano mediante la observación de la turbidez del medio a las 48 h de incubación, la cual indica crecimiento bacteriano; la siguiente prueba realizada fue la de suspensión cuantitativa, la cual determina si el crecimiento observado en la prueba anterior es significativo como para clasificar a la cepa como resistente al biocida.

Se utilizó como control de sensibilidad la cepa HB101, la cual es sensible a ambos desinfectantes a todas las concentraciones evaluadas. Antes de realizar dichas pruebas se realizaron dos controles: el control de toxicidad, el cual comprueba que el neutralizante no es tóxico para las cepas evaluadas y el control de neutralización que comprueba que el neutralizante es capaz de inhibir el efecto del desinfectante, los resultados de dichos controles se presentan respectivamente en las tablas XII y XIII.

En la tabla XII se observa que todas las cepas evaluadas, incluyendo el control de sensibilidad crecieron en el caldo Letheen, lo cual indica que dicho neutralizante no es tóxico para las cepas a evaluar.

**Tabla XII.** Resultado del control de toxicidad del caldo Lethen sobre las cepas de *Shigella* spp. evaluadas.

Cepa	Crecimiento en el neutralizante	Cepa	Crecimiento en el neutralizante
HB101	+	2902	+
PPII2	+	7876	+
PCII3	+	370	+
PCII4	+	6890	+
PCII6	+	7889	+
PPIV2	+	5067	+
PPVI1	+	8407	+
PCVI4	+	8808	+
PPVII1	+	8489	+
PCIX2	+	258	+
PPXII2	+	202	+
PCXII2	+		

+: Presencia de crecimiento, -: Ausencia de crecimiento

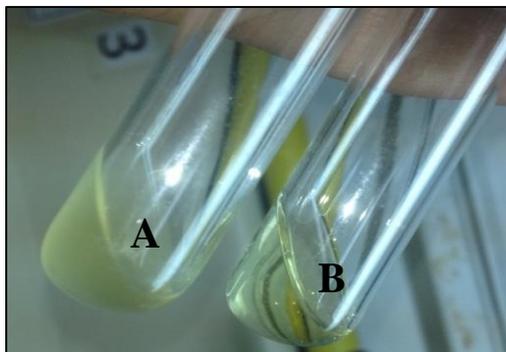
En la tabla XIII se observa que la cepa HB101, sensible a ambos agentes antimicrobianos fue capaz de crecer después de estar en contacto el desinfectante con el neutralizante durante el tiempo evaluado (5 min), esto indica que el neutralizante es capaz de inhibir el efecto del agente antimicrobiano en el tiempo y concentraciones ensayadas.

**Tabla XIII.** Resultado del control de neutralización del agente antimicrobiano realizado a las cepas de *Shigella* spp. evaluadas.

Concentración (%)	Cloro	Vinagre
0,5	+	+
1	+	+
1,5	+	+
2	+	+
15		+
50		+
75		+
100		+

+: Presencia de crecimiento, -: Ausencia de crecimiento

La resistencia en la prueba de rapidez de muerte celular se determinó por el crecimiento bacteriano evidenciado por la turbidez del medio como se observa en la figura 11:



**Figura 11.** Resultados de resistencia y sensibilidad en la prueba de rapidez de muerte celular a las 48 h de incubación. A: Turbidez en el medio que indica crecimiento bacteriano (resistencia), B: Ausencia de turbidez en el medio que indica ausencia de crecimiento bacteriano (sensibilidad).

En las tablas XIV y XV se presentan los resultados obtenidos para la prueba de rapidez de muerte celular con cloro y vinagre diluidos, quedando los productos activos en el caso del hipoclorito de sodio al 0,018%, 0,035%, 0,052%, 0,07% y 0,18% (cloro al 0,5%, 1%, 1,5%, 2% y 5%) y ácido acético al 1%, 1,5% y 2% (20%, 30% y 40%).

La evaluación de estos resultados se realizó por triplicado para verificar que las cepas no revirtieran el fenotipo de resistencia al agente antimicrobiano ensayado, aquellas que presentaron fenotipo de resistencia en una de las repeticiones se les realizó una repetición adicional confirmando el fenotipo de sensibilidad al agente.

De las 22 cepas evaluadas en cloro, el 100% fueron sensibles a concentraciones superiores al 2% (5% y 10%). 2 cepas fueron capaces de crecer en cloro hasta el 2%, es decir, 9,09% de las cepas fueron resistentes a esta concentración y a la de 1,5%, siendo 1 de alimentos y

una de pacientes (PCXII2 y 8407 respectivamente), 1 (4,54%) fue capaz de crecer hasta el 1% y 1 al 0,5%, ambas pacientes (370 y 8489 respectivamente).

**Tabla XIV.** Resultados de la prueba de rapidez de muerte celular con cloro diluido al 0,5%, 1%, 1,5% y 2% en las cepas de *Shigella* spp. evaluadas.

Cepa	0,5%	1%	1,5%	2%	5%
HB101	-	-	-	-	-
PPII2	-	-	-	-	-
PCII3	-	-	-	-	-
PCII4	-	-	-	-	-
PCII6	-	-	-	-	-
PPIV2	-	-	-	-	-
PPVI1	-	-	-	-	-
PCVI4	-	-	-	-	-
PPVII1	-	-	-	-	-
PCIX2	-	-	-	-	-
PPXII2	-	-	-	-	-
PCXII2	+	+	+	+	-
2902	-	-	-	-	-
7876	-	-	-	-	-
370	+	+	-	-	-
6890	-	-	-	-	-
7889	-	-	-	-	-
5067	-	-	-	-	-
8407	+	+	+	+	-
8808	-	-	-	-	-
8489	+	-	-	-	-
258	-	-	-	-	-
202	-	-	-	-	-

+: Presencia de crecimiento, -: Ausencia de crecimiento

En cuanto al vinagre, el 100% de las cepas fueron sensibles a concentraciones superiores a 30% (40%, 50%, 75% y 100%) y todas las cepas e incluso el control de sensibilidad fueron resistentes a concentraciones inferiores al 30% (2%, 15% y 20%). Al 30%, 3 de las cepas (13,64%) fueron resistentes, donde 1 es de alimentos (PCII3) y 2 de pacientes (2902 y 202).

**Tabla XV.** Resultados de la prueba de rapidez de muerte celular con vinagre diluido al 20%, 30% y 40% en las cepas de *Shigella* spp. evaluadas.

Cepa	20%	30%	40%
<b>HB101</b>	+	-	-
<b>PPII2</b>	+	-	-
<b>PCII3</b>	+	+	-
<b>PCII4</b>	+	-	-
<b>PCII6</b>	+	-	-
<b>PPIV2</b>	+	-	-
<b>PPVI1</b>	+	-	-
<b>PCVI4</b>	+	-	-
<b>PPVII1</b>	+	-	-
<b>PCIX2</b>	+	-	-
<b>PPXII2</b>	+	-	-
<b>PCXII2</b>	+	-	-
<b>2902</b>	+	+	-
<b>7876</b>	+	-	-
<b>370</b>	+	-	-
<b>6890</b>	+	-	-
<b>7889</b>	+	-	-
<b>5067</b>	+	-	-
<b>8407</b>	+	-	-
<b>8808</b>	+	-	-
<b>8489</b>	+	-	-
<b>258</b>	+	-	-
<b>202</b>	+	+	-

+: Presencia de crecimiento, -: Ausencia de crecimiento

La prueba de suspensión cuantitativa se realizó para las cepas que presentaron resistencia a una concentración determinada del antimicrobiano en la prueba de rapidez de muerte celular. Valores de la RV mayores o iguales a 5 permiten clasificar a la cepa como sensible al agente antimicrobiano y valores menores a 5, como resistente.

Con cloro todas las cepas fueron sensibles al 2%, 1 de las cepas (4,54%), es resistente hasta el 1,5% y 1 hasta el 1% siendo una de pacientes y otra de alimentos (8407 y PCXII2 respectivamente).

**Tabla XVI.** Resultado de la prueba de suspensión cuantitativa con cloro diluido al 0,5%, 1%, 1,5% y 2% en las cepas de *Shigella* spp. evaluadas.

<b>Título bacteriano (UFC/mL)</b>					
<b>Cepa</b>	<b>SA</b>	<b>0,5%</b>	<b>1%</b>	<b>1,5%</b>	<b>2%</b>
<b>HB101</b>	6×10 <sup>8</sup>	0	0	0	0
<b>PCXII2</b>	1,4×10 <sup>10</sup>	3×10 <sup>6</sup>	3×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	0
<b>370</b>	4,4×10 <sup>10</sup>	2,9×10 <sup>6</sup>	3×10 <sup>5</sup>	NP	NP
<b>8407</b>	4,2×10 <sup>10</sup>	3×10 <sup>6</sup>	2,5×10 <sup>6</sup>	2,3×10 <sup>6</sup>	2,2×10 <sup>5</sup>
<b>8489</b>	2,3×10 <sup>10</sup>	1×10 <sup>5</sup>	NP	NP	NP
<b>RV</b>					
<b>Cepa</b>		<b>0,5%</b>	<b>1%</b>	<b>1,5%</b>	<b>2%</b>
<b>HB101</b>		9	9	9	9
<b>PCXII2</b>		4	4	5	9
<b>370</b>		4	5	NP	NP
<b>8407</b>		4	4	4	5
<b>8489</b>		5	NP	NP	NP
<b>Clasificación</b>					
<b>Cepa</b>		<b>0,5%</b>	<b>1%</b>	<b>1,5%</b>	<b>2%</b>
<b>HB101</b>		S	S	S	S
<b>PCXII2</b>		R	R	S	S
<b>370</b>		R	S	NP	NP
<b>8407</b>		R	R	R	S
<b>8489</b>		S	NP	NP	NP

RV: Reducción de la viabilidad. SA: Sin antimicrobiano. R: Resistente, S: Sensible, NP: No probado.

Con vinagre se obtuvo que 2 cepas son resistentes al 30% (9,09%) siendo una de alimentos (PCII3) y una de pacientes (202).

**Tabla XVII.** Resultado de la prueba de suspensión cuantitativa con vinagre diluido al 30% en las cepas de *Shigella* spp. evaluadas.

Título bacteriano (UFC/mL)		
Cepa	SA	30%
HB101	$6 \times 10^8$	0
PCII3	$4,5 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^6$
2902	$5,2 \times 10^9$	$2 \times 10^3$
202	$5 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^6$
RV		
Cepa	30%	
HB101	9	
PCII3	4	
2902	6	
202	4	
Clasificación		
Cepa	30%	
HB101	S	
PCII3	R	
2902	S	
202	R	

RV: Reducción de la viabilidad. SA: Sin antimicrobiano. R: Resistente, S: Sensible

### 6.5.2 Determinación del fenotipo de resistencia a biocidas creciendo en biopelículas

Una vez clasificado el tipo de biopelículas formadas por cada cepa y determinado el fenotipo de resistencia a antimicrobianos creciendo en forma de vida planctónica, se evaluó el efecto del antimicrobiano creciendo en biopelículas utilizando el método de ensayo en microplacas. Las concentraciones de cloro evaluadas fueron 0,5%, 1%, 1,5% y 2%, las cuales fueron probadas en los ensayos para crecimiento planctónico. En el caso del vinagre como agente antimicrobiano se probaron las concentraciones de 5%, 15%, 30% y 60%, dos de ellas que permiten el crecimiento del microorganismo, otra que corresponde a la mínima concentración de las evaluadas que permite el crecimiento, y otra el doble de la

concentración que impide el desarrollo del microorganismo en forma de vida planctónica. En las figuras 12 y 13 puede observarse el efecto sobre la DO obtenida para cada una de las cepas con y sin el antimicrobiano ensayado a las distintas concentraciones y en las tablas XVIII y XIX se muestran las variaciones en el tipo de biopelícula formada sin antimicrobiano y a las concentraciones evaluadas.

La DO de cada una de las cepas disminuye en los tratamientos con cloro con respecto a los controles sin el antimicrobiano, donde se evidencia además una tendencia a disminuir a medida que la concentración del antimicrobiano se ve aumentada, inclusive en los controles de formación de biopelículas fuertes LBPAB4 y MPAO1 se observa tal disminución, por lo tanto, el antimicrobiano tiende a disminuir la biomasa de la biopelícula bacteriana, siendo más efectivo a concentraciones mayores.

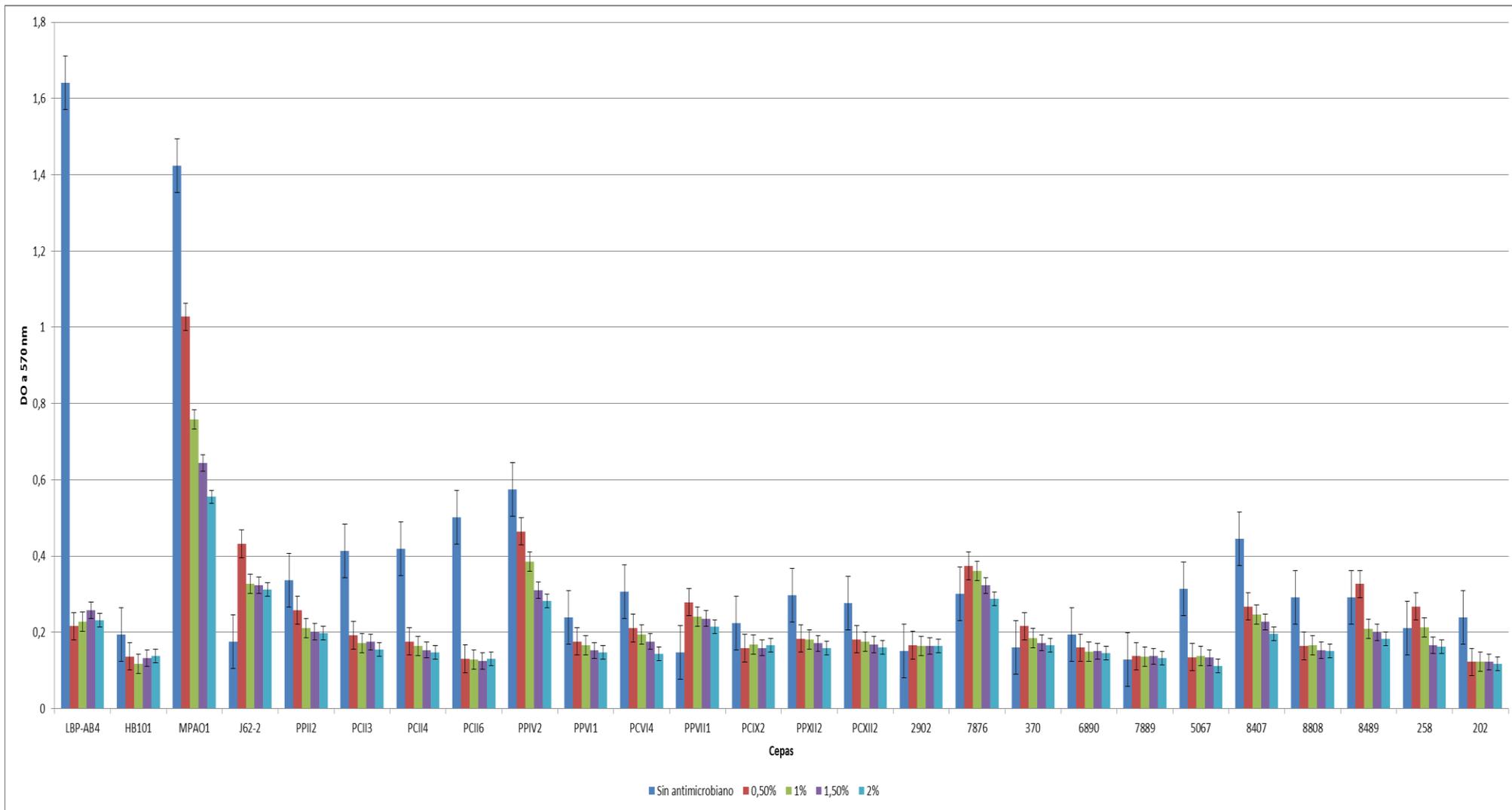
Las cepas LBP-AB4, MPAO1, HB101 y J62-2 son controles positivos y negativos del proceso de formación de biopelículas, desconociéndose si estos funcionaban como controles de formación de biopelículas en presencia de antimicrobianos, sin embargo fueron probados. El control MPAO1 se mantuvo como formador fuerte de biopelículas, por el contrario, el control LPB-AB4 disminuyó el tipo de biopelícula formada; ambos controles fuertes, las cepas HB101 y J62-2 fueron no formadores a las cuatro concentraciones, lo que permitió establecer un control y verificación de los resultados en cuanto a las estructuras formadas para las cepas a evaluar.

Con cloro, de las 22 cepas evaluadas, 12 (50%) disminuyeron el tipo de biopelícula formada a las cuatro concentraciones ensayadas de las cuales 7 provienen de alimentos (PPII2, PCII3, PCII4, PCII6, PPIV2, PCVI4 y PPXII2) y 4 de pacientes (5067, 8407, 8808 y 202), 1 (4,54%) disminuyó a partir del 1% proveniente de pacientes (8489) y las 10

restantes (45,45%) no presentaron variación en la formación, siendo 4 de alimentos (PPVII, PPVIII, PCIX2 y PCXII2) y 6 de pacientes (2902, 7876, 370, 6890, 7889 y 258).

En este sentido se menciona como fueron las variaciones presentadas en cuanto a la clasificación del tipo de biopelícula formada: en el caso de las cepas PPII2, PCII3, PCII4, PCII6, PCVI4, PPXII, 8407, 8808 y 8489 pasaron de ser formadoras moderadas a débiles, la cepa PPIV2 pasó de ser formadora fuerte a moderada y las cepas 5067 y 202 pasaron de ser formadoras moderada y débil respectivamente a no formadoras.

**Figura 12.** DO obtenidas para cada una de las cepas de *Shigella* spp. tratadas a distintas concentraciones de cloro.



**Tabla XVIII.** Biopelículas formadas con cloro diluido al 0,5%, 1%, 1,5% y 2%.

Cepa	SA	0,50%	1%	1,50%	2%
<b>LBP-AB4</b>	FF	FD	FD	FD	FD
<b>HB101</b>	FD	NF	NF	NF	NF
<b>MPAO1</b>	FF	FF	FF	FF	FF
<b>J-622</b>	FD	NF	NF	NF	NF
<b>PPII2</b>	FM	FD	FD	FD	FD
<b>PCII3</b>	FM	FD	FD	FD	FD
<b>PCII4</b>	FM	FD	FD	FD	FD
<b>PCII6</b>	FM	NF	NF	NF	NF
<b>PPIV2</b>	FF	FM	FM	FM	FM
<b>PPVI1</b>	FD	FD	FD	FD	FD
<b>PCVI4</b>	FM	FD	FD	FD	FD
<b>PPVII1</b>	FD	FD	FD	FD	FD
<b>PCIX2</b>	FD	FD	FD	FD	FD
<b>PPXII2</b>	FM	FD	FD	FD	FD
<b>PCXII2</b>	FD	FD	FD	FD	FD
<b>2902</b>	FD	FD	FD	FD	FD
<b>7876</b>	FM	FM	FM	FM	FM
<b>370</b>	FD	FD	FD	FD	FD
<b>6890</b>	FD	FD	FD	FD	FD
<b>7889</b>	NF	NF	NF	NF	NF
<b>5067</b>	FM	NF	NF	NF	NF
<b>8407</b>	FM	FD	FD	FD	FD
<b>8808</b>	FM	FD	FD	FD	FD
<b>8489</b>	FM	FM	FD	FD	FD
<b>258</b>	FD	FD	FD	FD	FD
<b>202</b>	FD	NF	NF	NF	NF

SA: Sin antimicrobiano. FF: Formadora de biopelículas fuertes, FM: Formadora de biopelículas moderadas, FD: Formadora de biopelículas débiles, NF: No formadora de biopelículas.

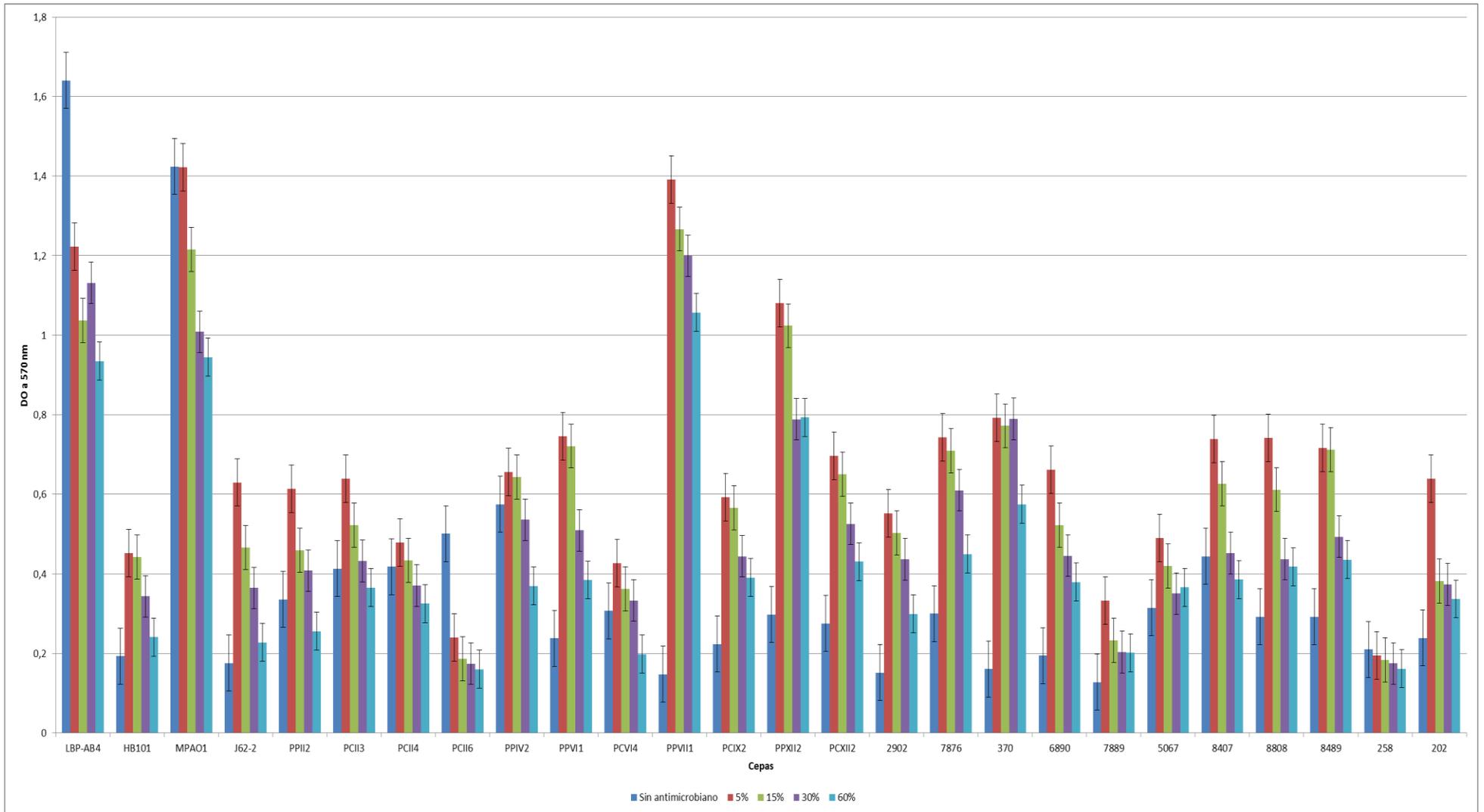
La DO de cada una de las cepas aumenta en los tratamientos con vinagre con respecto a los controles sin el antimicrobiano, donde además puede observarse una tendencia a disminuir a medida que la concentración del antimicrobiano se ve aumentada, por lo tanto, el antimicrobiano tiende a aumentar la biomasa de la biopelícula formada, intensificando tal efecto a concentraciones menores.

Los resultados obtenidos con el vinagre comercial en el caso de los controles fuertes y débiles también ayudaron a la correcta clasificación de la biopelícula para *Shigella* spp. pues los controles LBP-AB4 y MPAO1 se mantuvieron como formadores fuertes de biopelículas, en cuanto a los controles negativos HB101 y J62-2 aumentaron la formación.

En cuanto a las cepas evaluadas, exhibieron el siguiente comportamiento: 6 cepas (27,27%) disminuyeron la biopelícula formada, 5 de alimentos (PPII2, PCII4, PCII6, PPIV2 y PCVI4) y 1 de pacientes (258). Por otro lado, 6 cepas (31,82%) aumentaron la formación de biopelículas a las 4 concentraciones ensayadas, 4 de alimentos (PPVIII1, PPXII2, PCIX2, PCXII2) y 2 de pacientes (6890 y 202).

Otro comportamiento se pudo observar durante esta experiencia, fue el hecho de que algunas cepas tuvieron una variación del tipo de estructura formada, es decir, produjeron un aumento en la formación de biopelículas a alguna concentraciones ensayadas, retornando a su clasificación inicial sin antimicrobiano o disminuyendo la biopelícula formada a concentraciones mayores, 6 cepas (22,73%) tuvieron este comportamiento, 1 de alimentos (PPVII1) y 5 de pacientes (2902, 7876, 370, 8407 y 8808) donde 2 cepas (8407 y 8808) aumentaron la formación hasta el 5%, volviendo a obtener su clasificación inicial al 15%; 2 cepas aumentaron la formación hasta el 15%, donde una volvió a obtener su clasificación inicial al 30% (7876) y la otra sólo disminuyó (PPVII1), obteniendo aun una clasificación mayor que sin antimicrobiano; 1 cepa (2902) aumentó la formación de biopelículas hasta el 30% volviendo a obtener su clasificación inicial al 60% y 1 cepa (370) aumentó la formación hasta el 30% disminuyéndola al 60%. Finalmente, 4 cepas (18,18%) cepas no disminuyeron ni aumentaron la formación de biopelículas a ninguna de las concentraciones, siendo 1 de alimentos (PCII3) y 3 de pacientes (7889, 5067 y 8489).

**Figura 13.** DO obtenidas para cada una de las cepas de *Shigella* spp. tratadas a distintas concentraciones de vinagre.



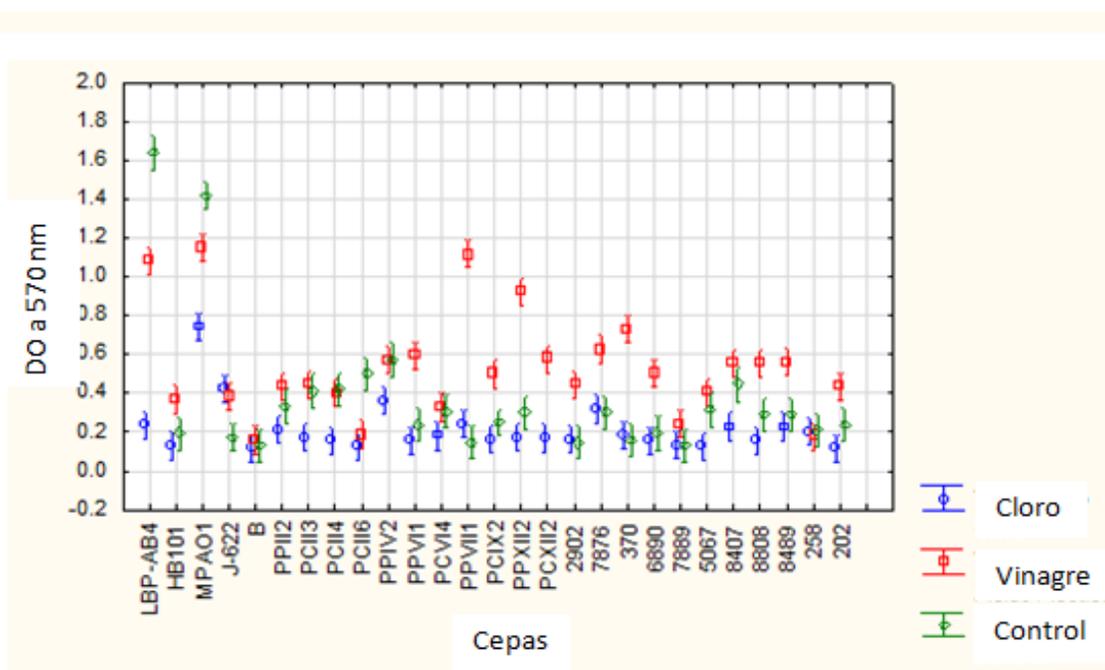
**Tabla XIX.** Biopelículas formadas con vinagre diluido al 5%, 15%, 30% y 60%.

<b>Cepa</b>	<b>SA</b>	<b>5%</b>	<b>15%</b>	<b>30%</b>	<b>60%</b>
<b>LBP-AB4</b>	FF	FF	FF	FF	FF
<b>HB101</b>	FD	FM	FM	FM	FD
<b>MPAO1</b>	FF	FF	FF	FF	FF
<b>J-622</b>	FD	FM	FM	FM	FD
<b>PPII2</b>	FM	FM	FM	FM	FD
<b>PCII3</b>	FM	FM	FM	FM	FM
<b>PCII4</b>	FM	FM	FM	FM	FD
<b>PCII6</b>	FM	FD	FD	FD	NF
<b>PPIV2</b>	FF	FM	FM	FM	FM
<b>PPVI1</b>	FD	FF	FF	FM	FM
<b>PCVI4</b>	FM	FM	FM	FD	FD
<b>PPVII1</b>	FD	FF	FF	FF	FF
<b>PCIX2</b>	FD	FM	FM	FM	FM
<b>PPXII2</b>	FM	FF	FF	FF	FF
<b>PCXII2</b>	FD	FM	FM	FM	FM
<b>2902</b>	FD	FM	FM	FM	FD
<b>7876</b>	FM	FF	FF	FF	FM
<b>370</b>	FD	FF	FF	FF	FM
<b>6890</b>	FD	FM	FM	FM	FM
<b>7889</b>	NF	NF	NF	NF	NF
<b>5067</b>	FM	FM	FM	FM	FM
<b>8407</b>	FM	FF	FM	FM	FM
<b>8808</b>	FM	FF	FM	FM	FM
<b>8489</b>	FM	FF	FF	FM	FM
<b>258</b>	FD	FD	FD	FD	NF
<b>202</b>	FD	FM	FM	FM	FM

SA: Sin antimicrobiano. FF: Formadora de biopelículas fuertes, FM: Formadora de biopelículas moderadas, FD: Formadora de biopelículas débiles, NF: No formadora de biopelículas.

Adicionalmente se realizó un análisis de varianzas obteniendo valores de  $p < 0,05$  para cada una de las variables (cepas y tratamientos aplicados) y para la interacción de ambas, por lo que se rechazan las hipótesis nulas: existen diferencias significativas entre las DO de las distintas cepas evaluadas y entre las DO de las cepas con los distintos tratamientos con biocidas aplicados.

Se puede observar además en la figura 14, el efecto de los dos antimicrobianos probados en la formación de biopelículas en cada una de las cepas, obteniendo para el cloro una tendencia disminuir o mantener la DO con respecto al control sin antimicrobianos, es decir, este desinfectante disminuye la formación de biopelículas. Para el vinagre se observan distintos comportamientos, donde la mayoría de las cepas tienden a aumentar la formación de biopelículas y pocas la disminuyen o se mantienen con respecto al control.



**Figura 14.** Comparación de los datos de la prueba estadística de ANOVA de dos vías para las DO de las cepas de *S. sonnei* y *S. flexneri* formando biopelículas con y sin antimicrobianos (cloro y vinagre).

## 7. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana a diversas sustancias es un grave problema de salud pública que puede observarse a nivel mundial; las principales causas de este problema son el uso inadecuado de diversos agentes antimicrobianos por la sobre prescripción de antibióticos en la medicina, prácticas veterinarias en la cría de animales, y además, el uso de biocidas en la práctica clínica, y a nivel industrial y doméstico (Gilbert y McBain, 2003).

Para entender mejor el problema de la resistencia bacteriana se debe hacer referencia a la información hereditaria que reside en el cromosoma y en los plásmidos, que son elementos extracromosómicos que se replican en forma autónoma e independiente del cromosoma que los aloja y son transmitidos de un microorganismo a otro mediante procesos como la conjugación, transformación y transducción bacteriana (Carmona y Silva, 2002).

La resistencia bacteriana es la consecuencia de la presión selectiva, donde participa la selección de factores de resistencia existentes en las bacterias y la inserción de plásmidos presentes en las bacterias (Carmona y Silva, 2002).

Los problemas asociados con el desarrollo y propagación de la resistencia a antibióticos a nivel clínico, ha aumentado desde los años 1960 y es una importante amenaza, a la práctica clínica (Gilbert y McBain, 2003), debido a que ha conllevado al fracaso de los tratamientos utilizados para tratar las infecciones bacterianas, muriendo aquellos que son sensibles y condicionando la aparición y selección de cepas resistentes a estos agentes. Además, también ha incrementado la resistencia a otros agentes antimicrobianos como los biocidas, constituyendo un gran reto a nivel industrial para prever la contaminación del producto y la adquisición de dichas infecciones por el consumidor.

Las especies de *Shigella* constituyen un patógeno de gran importancia en la salud pública, siendo uno de los principales microorganismos invasores de la mucosa intestinal del hombre, junto con *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *E. coli*, entre otros microorganismos; la transmisión de este grupo bacteriano es fundamentalmente de persona a persona por contaminación de la boca con las manos o alimentos portadores del agente (Mata, 1982), por lo tanto, infecciones causadas por este microorganismo suponen contaminación fecal del alimento, debido a inadecuadas prácticas de manufactura y contaminación cruzada en los mataderos. La OMS recomienda como tratamiento de primera línea tanto para niños como para adultos, la ciprofloxacina y como segunda línea la ceftriaxona o azitromicina, sin embargo, se han reportado resistencias a antibióticos como la ciprofloxacina, cefalosporinas de tercera generación donde se incluye la ceftriaxona y a quinolonas (Riveros y Ochoa, 2015).

Las cepas utilizadas en este estudio tuvieron dos proveniencias: de alimentos contaminados por *Shigella* spp, y de pacientes con enfermedades diarreicas causadas por este microorganismo, donde se corroboró su clasificación como *Shigella* spp. mediante la realización de pruebas bioquímicas y microbiológicas; en todas las muestras provenientes de alimentos se encontró este microorganismo a pesar de que estos fueron comprados en dos expendios comerciales distintos donde el proceso de manipulación puede que sea distinto, siendo uno una carnicería que presenta fallas tanto en las condiciones higiénicas sanitarias, como las de mantenimiento de la cadena frío y un supermercado. Dicho microorganismo no debería encontrarse, ya que este género bacteriano es sensible a temperaturas bajas, lo que sugiere además un inadecuado proceso de refrigeración en ambos expendios; asimismo, las muestras obtenidas de pacientes fueron obtenidas a partir

de individuos de distintas edades donde se incluyen niños y adultos, evidenciándose dichas infecciones a lo largo del tiempo ya que las muestras fueron obtenidas en distintos años.

La realización de pruebas bioquímicas permite la identificación y clasificación taxonómica bacteriana, mediante la determinación de las características metabólicas de los microorganismos, además, pruebas como la tinción Gram permiten la clasificación de los microorganismos de acuerdo a la estructura y morfología bacteriana. Los 22 aislados concordaron con la clasificación correspondiente para *Shigella* spp.

Una vez corroboradas las características bioquímicas y microbiológicas de las cepas de estudio, se evaluaron los fenotipos de resistencia a distintos antibióticos, se encontró que hubo resistencia a 7 de los 12 antibióticos evaluados, no se encontraron grandes diferencias entre el número de antibióticos y fenotipo obtenidos entre las cepas clínicas y de alimentos, la misma cantidad de ambos tipos de cepas presentaron resistencia a 3 antibióticos, aunque las cepas de alimentos presentaron mayoritariamente resistencia a menor cantidad de antibióticos (2 antibióticos) y las cepas clínicas presentaron mayoritariamente resistencia a mayor cantidad de antibióticos (5 y 6 antibióticos), por otro lado, los fenotipos III, IV, V, VI, VII, VIII y IX fueron presentados cada uno por una cepa distinta (PPVII1, 2902, PCXII2, 7889, 8808, 258 y 202), el fenotipo I fue presentado por 7 cepas de alimentos y 5 clínicas (PPII2, PCII3, PCII4, PPIVE, PPVII1, PCVI4, PCIX2, 7876, 370, 6890, 8407 y 8489 respectivamente) y el II por una de alimento y 2 clínicas (PCII6 y 5067 respectivamente). Estas cepas pudieron estar bajo la presión selectiva de estos antimicrobianos ya sea por los tratamientos utilizados en infecciones que o por su utilización en animales consumidos, que bien pudieron administrarse de manera inadecuada, asimismo, la resistencia pudo estar conferida por medio de plásmidos.

20 cepas fueron resistentes a STR y a SXT, siendo 19 de ellas las mismas cepas, donde 12 contienen el fenotipo I (STR, SXT), 3 el fenotipo II (AMC, AMP, CAZ, STR, TCY, SXT), y tres cepas distintas presentan los fenotipos III (CAZ, STR, SXT), V (STR, KAN, SXT), VI (CAZ, STR), VII (AMP, CAZ, CTX, STR, SXT), VIII (AMC, AMP, TCY) y IX (AMC, TCY, SXT) respectivamente (tabla IX). Los antibióticos STR y SXT (fenotipo I) poseen dos mecanismos de acción distintos (inhibición de la síntesis de proteínas a nivel de la subunidad ribosomal 30S y del metabolismo del ácido fólico respectivamente), siendo el primero un aminoglucósido y el segundo una combinación de una diaminopirimidina con una sulfonamida, sin embargo puede que su mecanismo de resistencia esté relacionado, como por ejemplo, la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, impidiendo su entrada a la célula.

6 de las cepas fueron resistentes a AMC, AMP, CAZ y TCY y 1 resistente a CTX y KAN, siendo estos una quinona (TCY), un aminoglucósido (KAN) y el resto  $\beta$ -lactámicos, con mecanismos de acción de inhibición de la síntesis de proteínas a nivel de la subunidad 30S en caso de las tetraciclinas y aminoglucósidos e inhibidores de la síntesis de la pared celular en caso de los  $\beta$ -lactámicos. El 100% de las cepas fueron sensibles a FOX, CRO, IPM y AMK ( $\beta$ -lactámicos y aminoglucósido).

Se han reportado resistencia en cepas de *Shigella* spp. a antibióticos pertenecientes a los aminoglucósidos y tetraciclinas, tal como se ha obtenido en este estudio: Lung Li y col. (2016) evaluaron los perfiles de resistencia en 204 aislados de *Shigella* spp. de pacientes con enfermedades diarreicas, donde 134 fueron multirresistentes, 80 fueron resistentes a aminoglucósidos, incluyendo la estreptomicina y 94 resistentes a la tetraciclina. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Flores y col. (1998), debido a que encontraron

que de 57 aislados de *S. sonnei* y *S. flexneri*, de niños con enfermedades diarreicas, 35 fueron resistentes a SXT, asociado con diversos patrones de resistencia donde el más común fue STR-SXT en 36 de los aislados. Por su parte, las resistencias encontradas en nuestro estudio concuerdan con las obtenidas por Sandra y col. (2002) quienes obtuvieron a partir de 259 cepas de *Shigella* spp., aisladas de niños con diarrea, que 238 de ellas eran multirresistentes, 187 resistentes a SXT, 167 resistentes a la AMP, 74 a TCY, 16 a CAZ y 15 a AMK, también concuerdan con los resultados obtenidos por MoezArdalan (2003), que muestran que de 123 cepas pertenecientes a las 4 especies de *Shigella* aisladas de pacientes con diarreas agudas, 108 fueron multirresistentes, 90 de ellas resistentes a la TCY, 87 resistentes al SXT y AMC y 8 resistentes a la CRO.

A pesar de que se obtuvo resistencia a distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos como la AMP (penicilina), CAZ y CTX (cefalosporinas) por parte de algunos microorganismos, también se obtuvo el 100% de sensibilidad para FOX, CRO (cefalosporinas) e IMP (carbapenémico), lo cual indica una posible ausencia de cepas productoras de BLEE, se realizó la prueba de sinergismo de doble disco para detectar su presencia, confirmando esta afirmación ya que no se observó dicho sinergismo (figura 9). Estas enzimas son producidas por bacterias Gram negativas y le confieren resistencia a las penicilinas, cefalosporinas y al aztreonam, pero no a los carbapenémicos ni a las cefamicinas y la mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico (Máttar y Martínez, 2007); con frecuencia las bacterias productoras de BLEE, expresan resistencia a otros grupos de antimicrobianos incluidos los aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol (Padilla, 2011). En este estudio, este hallazgo es de gran importancia ya que este tipo de antibióticos son de primera elección en el

tratamiento de infecciones extraintestinales en *Shigella*, cuando las bacterias presentan resistencia a las fluoroquinolonas (Tijerino y col., 2016).

Entre los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos se involucran la alteración o hiperproducción de las enzimas diana, en este caso las Proteínas de Unión a la Penicilina (PBPs) que son necesarias para que la bacteria forme su pared celular y los antibióticos se fijan a estas enzimas impidiéndolo; otro mecanismo es la alteración de la membrana externa y la producción de enzimas inactivantes ( $\beta$ -lactamasas) (Daza, 1998). Ya que no se encontró la presencia de BLEE, se sugiere que la resistencia generada ante los  $\beta$ -lactámicos evaluados puede deberse a la alteración o hiperproducción de las PBPs o alteración de la pared celular.

Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Tijerino y col. (2016), quienes descartaron la presencia de BLEE en cepas de *S. sonnei* con perfil sugestivo de presencia de BLEE por poseer resistencia a cefalosporinas de tercera generación, ya que no observaron la inhibición “efecto huevo” entre la AMC y las cefalosporinas de tercera generación evaluadas, las cuales fueron CAZ y la CTX.

Luego de evaluar el fenotipo de resistencia a antibióticos se procedió a evaluar la capacidad de formación de biopelículas en las cepas, como son pocos los estudios realizados en *Shigella* en este aspecto, inicialmente se implementó la metodología del agar rojo congo, la cual determina la presencia de exopolisacáridos debido a su producción, a través de la adherencia al rojo congo, ya que este colorante posee una alta afinidad por los polisacáridos (Bravo y col., 2005); además, se logra observar presencia de moco a medida que aumenta el tiempo de incubación en la mitad de las cepas debido a un incremento en la producción de

EPS. Se determinó el tiempo en el que el EPS es formado para posteriormente evaluar el tipo de biopelícula formada en ese tiempo determinado.

Los exopolisacáridos son componentes esenciales que conforman a las biopelículas, constituido de sustancias poliméricas y protegen a los microorganismos que forman parte de ella ante agentes antimicrobianos y otros factores de estrés ambiental. Dependiendo de las células que conforman la biopelícula, como su especie, tamaño de población o tiempo de crecimiento, las microcolonias formadas pueden estar compuestas por 10-25% de células y 75-90% de matriz EPS (Navia y col., 2010), por lo que la determinación de la producción de polisacáridos es un indicador cualitativo para la detección de cepas formadoras de biopelículas.

La metodología de ensayo en microplacas permitió la clasificación de las biopelículas formadas en el tiempo estimado de producción de EPS, donde 21 de las 22 cepas evaluadas forman biopelículas, de las cuales, una resultó ser formadora fuerte, 11 moderadas y 9 débiles (tabla XI). A pesar de determinar la producción de polisacáridos en todas las cepas a las 72h, una de ellas fue clasificada como no formadora de biopelículas, pudiéndose deber a que faltan otros componentes en la matriz de EPS, tales como proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, entre otros, además de que puede que esta especie genere la estructura de la matriz de forma tardía a pesar de haber secretado EPS por lo que se debe evaluar el tipo de biopelícula formada a mayores tiempos.

De las 22 cepas evaluadas, a las 24 h sólo 2 de ellas produjeron colonias rojo claro sin moco, a las 48 h, 4 las produjeron y a las 72 h 11 produjeron colonias mucosas rojo intenso y 11 rojo claro sin moco (tabla X), esto sugiere que a partir de las 72 h, las 22 cepas de *Shigella* spp. ya son capaces de formar biopelículas, por lo que este tiempo fue el empleado

en la metodología de ensayo en microplacas. La presencia de moco así como la intensidad del color rojo indica abundancia de EPS.

La fisiología bacteriana de las cepas de *Shigella* spp. evaluadas en este estudio le permite formar distintos tipos de biopelículas ante diversas condiciones de estrés ambiental independientemente de su origen (clínico o de alimentos) a pesar de que las provenientes de alimentos formaron biopelículas más fuertes, en su totalidad fueron formadoras, siendo una formadora fuerte (PPIV2), 6 moderadas (PPII2, PCII3, PCII4, PCII6, PCVI4 y PPXII2) y 4 débiles (PPVI1, PPVIII1, PCIX2 y PCXII2), por el contrario, una de las provenientes de pacientes fue no formadora (7889), 5 fueron débiles (2902, 370, 6890, 258 y 202) y 5 moderadas (7876, 5067, 8407, 8808 y 8489). En cada caso, las condiciones de estrés son las que modulan la activación de factores de virulencia y resistencia ante diversos agentes, regulados de manera coordinada por diversos pools de genes que son modulados a través del *quorum sensing*, las sustancias producidas y secretadas por las células sirven de señales químicas para inducir la expresión de dichos factores (Ellafi y col., 2009)

Son pocos los estudios donde se reportan resultados en cuanto a la formación de biopelículas en especies de *Shigela*. Ellafi y col. (2011), determinaron la formación de biopelículas en cuatro cepas bajo condiciones de estrés (agua de mar) a las 24h de incubación y no hubo formación de biopelículas en condiciones nutritivas óptimas, por lo que la producción de EPS en células de vida libre o adheridas a una superficie, es una respuesta que generan algunas cepas ante condiciones de estrés nutritivo ya que comúnmente la producción de polisacáridos se da en condiciones donde la fuente de carbono se encuentra en exceso; esta producción de EPS promueve la adhesión al sustrato en las que se encuentran en vida libre, (Bengtsson, 1991).

La resistencia a los biocidas se evaluó mediante dos pruebas recomendadas por la AOAC, siguiendo sus criterios debido a que en Venezuela no se han establecido pruebas para determinar la resistencia a desinfectantes.

Previamente se realizaron los controles de toxicidad del agente neutralizante, este fue realizado para comprobar que el neutralizante, en este caso el caldo Letheen, no es tóxico para las cepas evaluadas, donde fue demostrado que todas, incluso el control de sensibilidad fueron capaces de crecer en la solución neutralizante (tabla XII), por lo que se descarta que la ausencia de crecimiento en las pruebas posteriores sea causada por el neutralizante empleado. Asimismo fue realizado el control de neutralización, el cual permite corroborar que el neutralizante es capaz de inhibir la acción del biocida en el tiempo evaluado, este fue ensayado con la cepa HB101 de *E. coli*, la cual presenta sensibilidad a todas las concentraciones de prueba de ambos biocidas, como esta presentó crecimiento (tabla XIII), el neutralizante puede utilizarse en las pruebas ya que detuvo el efecto del biocida a los 5 min antes de agregar la solución bacteriana. El caldo Letheen es capaz de neutralizar diversos desinfectantes debido a que presenta lecitina de soya que actúa como agente emulsificante, además de aportar nutrientes al medio de cultivo (Ramos y Alonso, 2010). Este agente neutralizante es recomendado por la AOAC para ser utilizado ante QAC, sin embargo, según los estudios realizados por Gómez (2013) fue útil para neutralizar cloro, corroborado en este estudio, además de que es capaz de neutralizar el ácido acético.

Inicialmente se evaluó la resistencia de las cepas ante ambos desinfectantes con la prueba de rapidez de muerte celular y aquellas en las que se observó crecimiento, se les realizó la prueba de suspensión cuantitativa, la cual determina si el crecimiento observado es lo

suficientemente alto como para clasificar a la cepa como resistente al agente antimicrobiano.

El cloro fue uno de los biocidas empleados, utilizado en los hogares y a nivel industrial para limpiar y desinfectar superficies. Las concentraciones de cloro evaluadas fueron 0,5%, 1%, 1,5% y 2%, las cuales corresponden a una concentración del compuesto activo del producto, hipoclorito de sodio al 0,018%, 0,035%, 0,052% y 0,07%. Según las instrucciones del etiquetado del producto, para limpiar y desinfectar, se recomienda utilizar una concentración de 15% aproximadamente durante 5-10 min y para desinfectar el agua de beber una concentración de 0,025% durante 30 min. Por otra parte, Sánchez-Saldaña y Sáenz (2005), recomiendan para desinfectar, diluciones de cloro entre 0,1% y 1% a partir de hipoclorito de sodio al 5,25%, dichas concentraciones corresponden a hipoclorito de sodio a 0,00525% y 0,0525%. Partiendo de las diferentes concentraciones y tiempos recomendados se emplearon las concentraciones y tiempo evaluados, considerando que si se modifica la concentración del desinfectante debe cambiarse el tiempo de acción para lograr el mismo efecto, además de que otros factores pueden afectar la eficacia del desinfectante, tales como el pH, temperatura, naturaleza y población microbiana y presencia de materiales extraños (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005).

En la prueba de rapidez de muerte celular realizada con cloro, se obtuvo para las 22 cepas evaluadas que sólo 2 de ellas fueron resistentes a las 4 concentraciones evaluadas siendo 1 de alimentos y 1 de pacientes (PCXII2 y 8407), 2 de pacientes fueron resistentes, una hasta el 1% (370) y otra solo al 0,5% (8489) durante 5 minutos de exposición (tabla XIV). De las cepas evaluadas en suspensión cuantitativa, aquellas que crecieron a las 4 concentraciones en la prueba de rapidez de muerte celular, una resultó ser resistente hasta 1,5% y otra hasta

1% (8407 y PCXII2 respectivamente), la que creció hasta 1% resultó ser resistente sólo a 0,5% (370) y la que creció a 0,5% resultó ser sensible (8489). El tipo de cepas que mayormente resistió al cloro fueron las provenientes de pacientes. El control HB101 es sensible a las 4 concentraciones de cloro evaluadas (tabla XVI).

Al comparar las concentraciones recomendadas con las utilizadas en este estudio, se considera el cloro al 2% (0,07% de hipoclorito de sodio) como un desinfectante eficiente ante *S. sonnei* y *S. flexneri* a los 5 min de exposición porque ninguna de las cepas es resistente a esta concentración en formato de vida planctónico, sin embargo, el cloro al 0,5% (0,018% de hipoclorito de sodio) también se puede considerar como eficiente ya que sólo 3 cepas de 22 fueron resistentes a esta concentración, quizás deba aumentarse el tiempo de exposición para eliminar todos los microorganismos por completo. El cloro es un potente agente germicida con amplio espectro de actividad, activo frente a bacterias, esporas, hongos, virus y protozoos, presentando efectos bactericidas rápidos, siendo un agente oxidante que inactiva proteínas enzimáticas, la presencia de materia orgánica disminuye su actividad (Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2005).

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Wu y col. (2000) en *Shigella sonnei* inoculando perejil con una mezcla de tres cepas, obtuvieron que estas eran resistentes al ser expuestas a hipoclorito de sodio hasta una concentración de 0,01% durante 5 min de exposición, siendo ya sensibles a partir de concentraciones de 0,015% en adelante, demostrando la efectividad del hipoclorito de sodio en este microorganismo a concentraciones inferiores a las utilizadas en el presente estudio a pesar de encontrar cepas resistentes a algunas concentraciones evaluadas.

En estudios realizados en otros microorganismos como por ejemplo, por Folsom y Frank (2006) en *Listeria monocytogenes*, aislados de muestras alimentarias, obtuvieron que de 13 cepas 9 fueron resistentes al hipoclorito de sodio al 0,006% y 4 fueron resistentes al 0,008% a los 5 min de exposición. Estas concentraciones se encuentran por debajo de las evaluadas en este estudio y entre las recomendadas.

Existen similitudes entre la resistencia en biocidas y antibióticos, en bacterias Gram negativas, se han desarrollado mecanismos de resistencia a biocidas que podrían conferir resistencia a algunos antibióticos, es decir, resistencia cruzada a distintos tipos de antimicrobianos. Esta relación se ha demostrado en condiciones de laboratorio con determinados grupos bacterianos, por ejemplo, la resistencia en estafilococos a bajas concentraciones de clorhexidina y QACs mediada por bombas de eflujo se ha relacionado con la presencia de genes de resistencia a bajas concentraciones a múltiples antimicrobianos; por otra parte, en *E. coli*, la resistencia a bisfenol triclosan se relaciona con la resistencia a diversos antibióticos (Russell, 2001).

De las 3 cepas que finalmente resultaron ser resistentes al cloro, inclusive a concentraciones superiores al 1%, dos provienen de pacientes y una de alimentos (370, 8407 y PCXII2), teniendo en común la resistencia a los antibióticos STR y SXT, la cepa de alimentos además posee resistencia a la KAN; aunque los mecanismos de acción de estos agentes antimicrobianos son distintos, los mecanismos de resistencia pueden estar involucrados. Los mecanismos de resistencia en aminoglucósidos (STR) que se pueden ver involucrados con el mecanismo de resistencia al cloro, es la inactivación del antimicrobiano mediante enzimas modificadoras por la fosforilación, acetilación y adenilación de grupos químicos o radicales presentes en la estructura, alteración del metabolismo energético y transporte

activo o por cambios en la composición de la membrana externa de la pared celular (Carmona y Silva, 2002).

El otro biocida evaluado, utilizado a nivel doméstico para limpiar y desinfectar alimentos es el vinagre, cuyo compuesto activo, el ácido acético es utilizado en la industria de alimentos como desinfectante y además como preservante y conservante. Las concentraciones de vinagre evaluadas en este estudio fueron 2%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75% y 100%, las cuales corresponden a una concentración del compuesto activo del producto de 0,1%, 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3,75% y 5%. Se encontraron varias referencias sobre las concentraciones de vinagre/ácido acético a usar para desinfectar, sin embargo, estas fueron variadas entre ellas, no pudiéndose establecer concentraciones en concreto, por ello se decidió evaluar una variedad, estas fueron: 2%, 15%, 50%, 75% y 100%, encontrando que todas las cepas, incluso el control de sensibilidad HB101 crecían al 2% y 15% de vinagre y ninguna de las cepas crecía a 50% o a concentraciones superiores, por lo que se decidió evaluar adicionalmente las concentraciones de 20%, 30% y 40%, obteniendo que incluso al 20% la cepa sensible HB101 y el resto de las cepas creció y a 40% ninguna lo hizo. Al 30% de vinagre, para las 22 cepas evaluadas, se obtuvo 3 cepas resistentes, 1 de alimentos (PCII3) y 2 de pacientes (2902 y 202) (tabla XV) a los 5 min de exposición, a estas cepas se les realizó la prueba de suspensión cuantitativa, donde 2 de ellas resultaron ser resistentes a esta concentración, siendo 1 de alimentos (PCII3) y 1 de pacientes (202), el control HB101 fue sensible (tabla XVII).

Existen estudios como el de In y col. (2012) quienes determinaron la MIC de diversos ácidos orgánicos, entre ellos el ácido acético, el cual es de grado molecular contra las cuatro especies diferentes de *Shigella*, determinando que era de 200 µg/mL (0,02%). Por su

parte, Baskett y Hentges (1973) determinaron que la concentración que inhibía completamente el crecimiento de *S. flexneri* era de 0,0018 M (0,011%), ellos sugieren que el ácido acético interfiere con el metabolismo celular ya que limita el consumo de nutrientes como la glucosa y el ácido glutámico. Por su parte, Wu y col. (2000) en *Shigella sonnei* inoculando perejil con una mezcla de tres cepas, obtuvieron resistencia a vinagre con concentraciones de ácido acético de 0,5%, 1% y 2,6% y sensibilidad a partir de 5,2% en adelante.

En general, los ácidos débiles dañan la membrana, pared celular y ácidos nucleicos e inactivan enzimas, las cuales inhiben reacciones metabólicas esenciales de la célula por la disminución del pH intracelular; la membrana celular es permeable al ácido débil por lo que permite su entrada, una vez dentro de la célula con un pH interno alto, neutraliza el ácido, disociándolo y acidificando el medio (Beales, 2004)

El ácido acético o vinagre, ha sido utilizado esporádicamente en la medicina cerca de 6000 años, siendo exitoso para tratar diversos tipos de infecciones y en la eliminación de *Bacillus pyocyaneus* e incluso *Pseudomonas aeruginosa*, además de ser implementado como un desinfectante y en la eliminación de microorganismos en productos frescos (Halstead y col., 2015). Las concentraciones de ácido acético que deben emplearse para la eliminación de microorganismos varían según la especie, se han erradicado infecciones *Pseudomonas aeruginosa* de quemaduras al agregar ácido acético del 1% al 5%, se ha logrado la desinfección al aplicar ácido acético al 6% en superficies contaminadas con *Mycobacterium tuberculosis*, se han erradicado biopelículas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* con ácido acético al 0,5% y 1% (Halstead y col., 2015).

Las 2 cepas que resultaron ser resistentes al vinagre al 30% también lo son al SXT, además, la de alimentos es resistente a la estreptomicina la de pacientes es resistente a la AMC y TCY. Los mecanismos de acción de los antimicrobianos ante los cuales se presenta resistencia en común no están relacionados, tampoco sus mecanismos de acción. El sulfametoxazol actúa como análogo de factores de crecimiento, ya que posee estructura similar al ácido p-aminobenzoico (PABA), precursor del ácido fólico, por lo que bloquea su síntesis; el ácido fólico es a su vez un precursor de los ácido nucleicos, la trimetoprima es un inhibidor de la síntesis de ADN ya que inhibe el metabolismo del folato, cofactor importante en la síntesis de purinas, y por lo tanto inhibe la síntesis de ADN (Madigan y col., 2004). Por otra parte, aunque el mecanismo de resistencia a ácidos no está claramente elucidado, se sugiere que está asociado con proteínas inducidas en condiciones de acidez. En *S. flexneri* se han encontrado tres de estos sistemas, específicamente de los sistemas de ácido-resistencia (AR), los cuales dependen de las condiciones del medio, el primero es el sistema de oxidación dependiente, el cual se expresa en bacterias oxidativas creciendo en medios ricos que no contienen glucosa y los otros dos sistemas se expresan en bacterias creciendo en medio rico o mínimo suplementado con arginina o glutamato (Beales, 2004). Poco es sabido sobre cómo estos sistemas protegen a las células en condiciones de acidez, sin embargo, se sugiere que los sistemas AR2 y AR3, consume los protones intracelulares a través de la descarboxilación de los aminoácidos (Rischar y Foster, 2004).

Las células que sobrevivieron a las concentraciones de los desinfectantes en la prueba de rapidez de muerte celular, pero no en la de suspensión cuantitativa, e incluso aquellas que lograron ser resistentes se puede sugerir que se trata de células persistentes. El fenotipo de persistencia es un rasgo epigenético manifestado por una subpoblación bacteriana y se

caracteriza por tener una tasa de crecimiento lento con la capacidad de sobrevivir a tratamientos antimicrobianos (Kussell y col., 2005).

La persistencia a agentes antimicrobianos no es hereditaria, ya que cultivos bacterianos generados a partir de células persistentes han resultado ser sensibles al antimicrobiano, además, este fenotipo se adquiere de forma espontánea y pueden retornar a su fenotipo de sensibilidad, siendo este un carácter adaptativo que depende fuertemente de las condiciones ambientales (Kussell y col., 2005), es por esto que se generaron pruebas por duplicado.

Las bacterias pueden protegerse de varios tipos de estrés de dos maneras: proliferando con el riesgo de morir o suprimir su crecimiento y permanecer protegidas bajo esas condiciones, en la mayoría de células de una población bacteriana ocurre lo primero, mientras que en una pequeña proporción el crecimiento se ve suprimido, esa baja proporción bacteriana es lo suficientemente alta como para salvar la población de su extinción en condiciones de estrés (Kussell y col., 2005).

Para corroborar si se trata de una población resistente o persistente se deben realizar las pruebas fenotípicas nuevamente a futuro, tomando las bacterias que crecen en presencia del agente determinando y verificar el % de crecimiento, ya que si sobrevive sólo un porcentaje de la población se trata de células persistentes debido a que el fenotipo de resistencia se revirtió, si crece el 100% la cepa puede ser considerada como resistente (Gómez, 2013).

Por otro lado, las cepas resistentes al cloro no fueron las mismas que resistieron al vinagre, por lo que se sugiere que los mecanismos de resistencia a estos agentes son distintos.

Al evaluar los fenotipos de resistencia a cloro y vinagre en las 22 cepas de *Shigella* spp. creciendo en forma de biopelículas, se encontró que en el caso del cloro, 10 de ellas

mantuvieron el mismo tipo de biopelícula formada al estar en presencia de las 4 concentraciones ensayadas (PPVII, PPVIII, PCIX2, PCXII2, 2902, 7876, 370, 6890, 7889 y 258) (tabla XVIII). Sin embargo, aunque 12 disminuyeron la biopelícula formada (PPII2, PCII3, PCII4, PCII6 PPIV2, PCVI4, PPXII2, 5067, 8407, 8808, 8489 y 202), sólo en 3 de las cepas se logró disminuir por completo a las 4 concentraciones llegando a ser clasificadas como no formadoras (PCII6, 5067); la no formadora se mantuvo bajo esta clasificación. Por otro lado, el cloro afectó las biopelículas formadas en 5 de 10 cepas provenientes de pacientes y en 7 de 11 cepas provenientes de alimentos, observando así, que este agente actuó más sobre las muestras provenientes de alimentos.

Estos resultados difieren con los obtenidos cuando las cepas se encuentran creciendo en forma planctónica, donde ninguna fue capaz de crecer a las 4 concentraciones empleadas, además, la cepa 8407 que resistió a las 3 primeras, disminuyó la formación de biopelículas de moderadas a débiles a las 4 concentraciones, y las PCXII2 y 370 que resistieron, tanto a las 2 primeras como a la primera concentración, se mantuvieron como formadoras débiles de biopelículas a las 4 concentraciones. Además, puede observarse como las DO de las cepas disminuyen en comparación con las de las cepas sin antimicrobianos (figura 12), donde concentraciones mayores del mismo tienden a disminuirla, es decir, la densidad celular que conforma la biopelícula se ve afectada por el cloro cuando este se encuentra en mayores proporciones. Por otra parte, según la prueba estadística de ANOVA existen diferencias entre la biopelícula formada con y sin cloro, observándose que el cloro disminuye su formación (figura 14). Debido a los resultados obtenidos se puede sugerir que el cloro es un desinfectante eficaz para evitar las biopelículas bacterianas en estas cepas de

*Shigella* spp. siendo recomendable implementar concentraciones mayores del producto para poder eliminar la biopelícula por completo.

Folsom y Frank (2006) en aislados de alimentos de *Listeria monocytogenes*, probaron no sólo el efecto del cloro en forma de vida libre sino en biopelículas, obteniendo que de 13 cepas 11 fueron resistentes al hipoclorito de sodio al 0,006%, las cepas sensibles en forma planctónica no fueron las mismas que fueron sensibles en forma de biopelículas, demostrando además que hay al menos distintos mecanismos para la resistencia al cloro, ya que presentaron resistencias diferentes en ambas formas de vida. En el caso de las cepas de *Shigella* evaluadas en este estudio podría suceder algo similar por las diferencias obtenidas en ambas formas de vida.

Uno de los mecanismos involucrados en la resistencia al cloro en biopelículas puede ser el impedimento físico que impone la matriz de EPS generando una penetración lenta del antimicrobiano o reducción del mismo, se ha demostrado en biopelículas formadas por *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* que la concentración del cloro disminuye en un 80%; asimismo se ha demostrado que el cloro a 25 mg/l (0,0025%) no penetra más allá de una profundidad de 100 µm de una matriz de 150-200 µm (Bridier y col., 2011). El cloro puede reaccionar con los componentes orgánicos de la matriz formada neutralizándolos, siendo esto demostrado en experimentos de cinética de difusión del mismo; por otra parte, la tolerancia ante agentes oxidantes como el cloro pueden además resultar por la tasa de crecimiento de los microorganismos (Araujo y col., 2011).

En cuanto al vinagre, se encontró que de las 22 cepas, sólo 4 fueron capaces de mantener el mismo tipo de biopelícula a las 4 concentraciones ensayadas (PCII3, 7889, 5067 y 8489)

(tabla XIX). 6 cepas disminuyeron la biopelícula formada (PPII2, PCII4, PCII6, PPIV2, PCVI4 y 258) donde 2 la disminuyeron por completo al 60% (PCII6 y 258); la no formadora se mantuvo bajo esta clasificación (7889). 12 cepas aumentaron biopelícula formada donde 6 fueron capaces de hacerlo hasta una de las concentraciones probadas (PPVII, 2902, 7876, 370, 8407 y 8808), a concentraciones superiores estas cepas mantuvieron su clasificación, es decir, no se vieron afectadas por el efecto del vinagre, o disminuyeron su clasificación, por lo que ciertas concentraciones de vinagre tienden a fomentar la formación de biopelículas. Por otro lado, el vinagre afectó las biopelículas formadas, disminuyendo su formación en 1 de 10 cepas provenientes de pacientes y en 5 de 11 cepas provenientes de alimentos, actuando más sobre las muestras provenientes de alimentos; además, aumentó su formación en 5 de 10 cepas provenientes de pacientes y en 1 proveniente de alimentos.

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos cuando las cepas se encuentran creciendo en forma planctónica, donde ninguna fue capaz de crecer a concentraciones superiores de 30%, siendo 2 cepas resistentes a esta concentración, la PCII3 no se vio afectada en la formación de biopelículas a ninguna de las concentraciones y la 202 incrementó su formación a las cuatro concentraciones; debido a los resultados obtenidos no se recomienda el vinagre como un desinfectante eficaz para eliminar las biopelículas bacterianas en estas cepas *Shigella* spp. a las concentraciones evaluadas, deben usarse concentraciones superiores para erradicar las biopelículas, además de que puede observarse como las DO de las cepas son mayores en comparación con las de las cepas sin antimicrobianos (figura 13), sin embargo, a concentraciones mayores del mismo se observan DO menores por lo que se sugiere que el vinagre es capaz de incentivar la formación de biopelículas siendo estas más

fuertes a concentraciones menores. Por otra parte, según los resultados obtenidos en la prueba estadística de ANOVA, se observa que el vinagre aumenta su formación con respecto a los controles sin antimicrobianos (figura 14), esto puede deberse a que estas cepas de *Shigella* spp. se encuentran en ambientes con presiones selectivas altas de acidez, ya que además sobreviven a concentraciones altas en forma de vida planctónica comparado con reportes de este género bacteriano (punto 7.5.1), por lo que concentraciones bajas del antimicrobiano pueden incentivar en gran manera su formación.

Estos resultados difieren con respecto a distintos reportes sobre el efecto del vinagre y ácido acético en la formación de biopelículas en distintos microorganismos. Akiyama y col. (2006) evaluaron el efecto del ácido acético en biopelículas inmaduras en aislados de *Staphylococcus aureus* de lesiones cutáneas, la formación de biopelículas se vio interrumpida luego de 1 h al 2,5% de ácido acético y a las 24 h al 0,25%. Narjis (2013) evaluó el efecto de distintos tipos de vinagre al 5% de ácido acético en 22 aislados de *Streptococcus pyogenes* formadoras de biopelículas aisladas de pacientes con amigdalitis, los cuales erradicaron las biopelículas formadas en un 22, 21 y 20 cepas con vinagre de dátil, manzana y uva respectivamente, no encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de vinagre empleados.

A pesar de que el ácido acético desencadena una reducción en la formación de biopelículas según los estudios mencionados, estas pueden tener como mecanismo de resistencia respuestas adaptativas a condiciones de estrés. Una de estas respuestas puede ser la activación de sistemas AR, descritas en *Shigella* spp., la cual aumenta el crecimiento celular y protege a las células a niveles de pH bajos, siendo el mantenimiento de la homeostasis del pH celular, la base para mantener y aumentar la tolerancia a la acidez en

las células que se encuentran en forma de vida de biopelículas (McNeill y Hamilton, 2004). Por otra parte, se ha demostrado que la regulación genética en la formación de biopelículas y la señalización celular involucra una variedad de rutas que están relacionadas no sólo con el inicio del ciclo de formación de biopelículas sino con su mantenimiento; además, se ha demostrado que la densidad celular puede modular la adaptación a pH ácidos, siendo las altas densidades más resistentes a estas condiciones que aquellas que poseen densidades celulares bajas (McNeill y Hamilton, 2004).

Por otro lado, aunque podría parecer contradictorio, se encuentran estudios como el de Koza y col. (2009), donde el  $\text{FeCl}_3$  induce el desarrollo de biopelículas en la cepa SBW25 *Pseudomonas fluorescens*, ya que induce la expresión de celulosa, componente de la matriz de exopolisacáridos que compone a las biopelículas, la fortaleza de las biopelículas formadas aumenta en biopelículas maduras, incrementando a concentraciones de 0-50  $\mu\text{M}$ , el hierro es un metal pesado, siendo muchos de estos utilizados como agentes antimicrobianos, ya que son capaces de precipitar las proteínas e inhibir los grupos sulfhidrilos (Sanchez-Saldaña y Sáenz, 2005).

## 8. CONCLUSIONES

- Se corroboró microbiológica y bioquímicamente la identificación de los aislados evaluados como *Shigella* spp. siendo estas bacterias Gram negativas, fermentadoras de glucosa, no fermentadores de lactosa, oxidantes y fermentadoras de manitol, no productoras de gas, no móviles, catalasa y nitrato y positivas y citrato, H<sub>2</sub>S, indol, urea, oxidasa y esculina negativas.
- De las 22 cepas de *Shigella* spp., 20 cepas (90,91%) fueron resistentes a STR y a SXT, 6 cepas (27,27%) fueron resistentes a AMC, AMP, CAZ y TCY y 1 cepa (4,54%) fue resistente a CTX y KAN, mostrándose 100% de sensibilidad a los antibióticos FOX, CRO, IPM y AMK.
- Todas las cepas presentaron resistencia a por lo menos dos antibióticos, siendo el fenotipo de resistencia I (STR, STX) el que se encontró mayoritariamente, expresado en 12 cepas (54,54%), presentándose además resistencias a tres, cinco y seis antibióticos.
- Las cepas de alimentos presentaron mayoritariamente resistencia a menor cantidad de antibióticos (2 antibióticos) y las cepas clínicas presentaron mayoritariamente resistencia a mayor cantidad de antibióticos (5 y 6 antibióticos). La misma cantidad de ambos tipos de cepas presentaron resistencia a 3 antibióticos.
- No se detectó la presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en ninguna de las cepas de *Shigella* spp evaluadas.
- La metodología de crecimiento en agar rojo congo es eficiente para determinar la presencia de exopolisacáridos, componente esencial en la formación de biopelículas y el tiempo característico fundamental en la producción de la misma. Se detectó la producción de EPS en mayor o menor proporción a las 72h en la mayoría de las cepas de *Shigella* spp. evaluadas.

- El análisis de clasificación de biopelículas en placas de Elisa permitió la siguiente clasificación: 1 cepa (4,54%) no formadora de biopelículas (7889), 9 cepas (40,9%) formadoras débiles (PPVII1, PPVIII1, PCIX2, PCXII2, 2902, 370, 6890, 258 y 202), 11 cepas (50%) formadoras moderadas (PPII2, PCII3, PCII4, PCII6, PCVI4, PPXII2, 7876, 5067, 8407, 8808 y 8489) y 1 cepa (4,54%) formadora fuerte (PPIV2).
- Las cepas provenientes de alimentos formaron biopelículas más fuertes, en su totalidad fueron formadoras, siendo una formadora fuerte (PPIV2), 6 moderadas (PPII2, PCII3, PCII4, PCII6, PCVI4 y PPXII2) y 4 débiles (PPVII1, PPVIII1, PCIX2 y PCXII2), por el contrario, una de las provenientes de pacientes fue no formadora (7889), 5 fueron débiles (2902, 370, 6890, 258 y 202) y 5 moderadas (7876, 5067, 8407, 8808 y 8489).
- El caldo Lethen representa un neutralizante eficaz de los efectos del ácido acético.
- Los resultados en forma de vida libre con cloro reflejan que de las 22 cepas evaluadas, 1 cepa (4,54%) presentó resistencia hasta el 1,5% (8407), 1 cepa hasta el 1% (PCXII2) y 1 cepa solo al 0,5% (370).
- En forma de vida libre con vinagre, 2 cepas (9,09%) presentaron resistencia al 30% (PCII3 y 202).
- Con cloro, en formato de crecimiento de biopelículas, 12 cepas (50%) disminuyeron la biopelícula formada a las cuatro concentraciones ensayadas (PPII2, PCII3, PCII4, PCII6, PPIV2, PCVI4, PPXII2, 5067, 8407, 8808, 8489 y 202) y 10 cepas (45,45%) no presentaron variación en la formación (PPVII1, PPVIII1, PCIX2, PCXII2, 2902, 7876, 370, 6890, 7889 y 258).
- Los ensayos del vinagre sobre la formación revelan distintos tipos de comportamiento, donde 6 cepas (27,27%) disminuyeron la biopelícula formada a distintas concentraciones (PPII2, PCII4, PCII6, PPIV2, PCVI4 y 258), 6 cepas (31,82%) aumentaron

la biopelícula a las 4 concentraciones ensayadas (PPVII1, PCIX2, PPXII2, PCXII2, 6890 y 202) y 6 cepas (22,73%) aumentaron la biopelícula formada hasta alguna de las concentraciones, retomando su clasificación inicial o disminuyendo a concentraciones mayores (PPVII1, 2902, 7876, 370, 8407 y 8808); por último, 4 cepas (18,18%) no presentaron variación en la formación (PCII3, 7889, 5067 y 8489).

- Tanto el cloro como el vinagre actuaron más sobre las biopelículas formadas por las cepas provenientes de alimentos, disminuyéndolas.
- El vinagre logró aumentar la formación de biopelículas más que disminuirlas., actuando mayormente en las cepas provenientes de alimentos.
- Este estudio representa un aporte sobre los mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos y sobre la capacidad de formación de biopelículas en distintas cepas *Shigella* spp., patógenos de interés clínico y sanitario, cuyos estudios son pocos en el país.

## 9. RECOMENDACIONES

*Shigella* es un enteropatógeno de gran importancia en salud pública, siendo necesario ampliar las investigaciones en cuanto su resistencia a distintos antimicrobianos en ambos formatos de crecimiento, por lo que se sugiere continuar los estudios en este ámbito, para llevar a cabo esta tarea se plantean las siguientes recomendaciones:

- Utilizar otros antibióticos de primera línea para el tratamiento de infecciones causadas por *Shigella* spp. en la evaluación del fenotipo de resistencia a antibióticos mediante el método de difusión en disco.
- Realizar pruebas moleculares que permitan determinar el origen del mecanismo de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos que bien podría ser por la alteración o hiperproducción de las PBPs o alteración de la pared celular ya que se ha demostrado que las cepas de *Shigella* spp. evaluadas en este estudio no presentan enzimas BLEE.
- Evaluar el tipo de biopelículas formadas en las cepas de *Shigella* spp. evaluadas en este estudio a tiempos superiores a las 72h.
- Evaluar el efecto de los antibióticos utilizados en este estudio sobre la formación de biopelículas en las cepas de *Shigella* spp. evaluadas.
- Evaluar el efecto del cloro y vinagre en distintas condiciones (tiempo, concentración, pH, temperatura) en las cepas de *Shigella* spp. evaluadas en este estudio.
- Probar concentraciones de vinagre mayores al 60% sobre el efecto en la formación de biopelículas en las cepas de *Shigella* spp. evaluadas. Así como otros preservantes utilizados en la industria de alimentos como ácido sórbico, benzóico y láctico, sorbato de potasio, de sodio y calcio, anhídrido sulfuroso y sulfitos, acetato de sodio y de calcio, entre otros.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Agtini, M., Rooswanti, S., Lesmana, M., Punjabi, N., Simanjuntak, C., Wangsasaputra, F., Nurdin, D., y col. 2005. The burden of diarrhoea, shigellosis, and cholera in North Jakarta Indonesia: findings from 24 months surveillance. *BMC Infect Diss.* **5(89)**: 1-11.
- Akiyama, H., Yamasaki, O., Jiro, J. 1999. Effects of acetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus*. *Arch Dermatol Res.* **291(10)**: 570-573
- Albarado, L., Guzmán, Y., Guzmán, M., Betancourt, J. 2005. *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. asociados con síndrome diarreico agudo en niños menores de seis años de edad. *Kasmera.* **33(2)**: 132-141.
- Anon. 1997. 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.
- Araújo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M. 2011. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* 826-834
- Ayala, S., Moreno, R.P., Araguas, J.L., Caprotta, C.G., Pena, R.M. 2006. Shock séptico por *Shigella flexneri*. *Arch Argent Pediatr.* **104(4)**: 351-353.
- Barrantes, K., Achí, R. 2011. Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga. *Rev Soc Ven Microbiol.* **31(1)**: 31-36.
- Barrantes, K., Achí, R., Bolaños, S., Cerdas, M., Cortés, X. 2006. Calidad microbiológica y aislamiento de *Shigella flexneri* en vegetales frescos del área metropolitana de Costa Rica, 2001-2002. *Boletín de Avances de Investigación en Seguridad Alimentaria y Nutricional (SAN).* **31(1)**: 31-36
- Baskett, R.C., Hentges, D.J. 1973. *Shigella flexneri* Inhibition by Acetic Acid. *Infect Immunity.* **8(1)**: 91-97.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* **4(4)**: 40-44.
- Beales, N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Compr Rev Food Saf.* **3**: 1-20.

- Bengtsson, G. 1991. Bacterial exopolymer and PHB production in fluctuating ground-water habitats. *FEMS Microbiol Ecol.* **86(1)**: 15-24.
- Bravo, L., Salazar, D., Arce, M.A., García, H., Ramírez, M., Cabrera, L.E., Fernández, A., Castañeda, N. Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de animales domésticos y afectivos. *Rev Electrón Vet.* **6(10)**: 1-12.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling.* **27(9)**: 1017-1032.
- Carmona, O., Silva, H. 2002. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. *Archiv Venez Farmac y Terap.* **13**: 39-56.
- Castrillón, L. E., Palma, A., Padilla, M.D. 2010. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatologia Rev Mex.* **54(1)**: 14-24.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27<sup>th</sup> Edition.
- Daza, R.M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud.* **22**: 57-67.
- Davies, D. 2003. Resistance to antibacterial agents. *Nature.* **2(2)**: 114-122.
- Ellafi, A., Lagha, R., Abdallah, F., Bakhrouf, A. 2001. Biofilm production, adherence and hydrophobicity of starved *Shigella* in seawater. *Afr J Microbiol Res.* **6(20)**: 4355-4359.
- EN Disinfectant Test Methods 1040: Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical .disinfectants and antiseptics-Test method and requirements (phase1). Disponible [En línea] en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/AFNOR-biocides.pdf>. [Consulta: marzo de 2018].
- Flores, A., Araque, M., Vizcaya, L. 1998. Multiresistant *Shigella* Species Isolated From Pediatric Patients With Acute Diarrheal Disease. *Am J Med Sci.* **316(6)**: 379-384
- Folsom, J., Frank, J. 2006. Chlorine Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms and Relationship to Subtype, Cell Density, and Planktonic Cell Chlorine Resistance. *J Food Prot.* **69(6)**: 1292-1296.
- Gnanadhas, D. P., Marathe, S. A., Chakravorty, D. 2013. Biocides-resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin Investig Drugs.* **22(2)**: 191-206.

- Gómez, D. 2013. Estudio del fenotipo de resistencia a desinfectantes en bacterias aisladas de pacientes con infecciones en el tracto urinario. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Gómez, J., Gómez-Lus, M.L., Bas, P., Ramos, C., Cafini, F., Maestre, J.R., Prieto, J. 2013. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? *Rev Esp Quimioter.* **26(2)**: 97-102.
- Gunduz, G., Tuncel, G. 2006. Biofilm formation in an ice cream plant. *Anton Van Leeuwenhoek.* **89(3-4)**: 329-336.
- Halstead, F.D., Rauf, M., Moiemmen, N.S., Bamford, A., Wearn, C.M., Fraise, A.P., Lund, P.A., Oppenheim, B.A., Webber, M.A. 2015. The Antibacterial Activity of Acetic Acid against Biofilm-Producing Pathogens of Relevance to Burns Patients. *PLoS One.* **10(9)**: 1-15.
- Harrison, J.J., Ceri, H., Turner, R.J. 2007. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature.* **5(12)**: 928-938.
- In, Y., Kim, J., Kim, H., Oh, S. 2012. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against *Shigella* species. *J Food Saf.* **33**:79-85.
- Koza, A., Hallett, P.D., Moon, C.D., Spiers, A.J. 2009. Characterization of a novel air-liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Microbiology.* **155(5)**: 1397-1406.
- Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N.Q., Leibler, S. 2005. Bacterial Persistence: A Model of Survival in Changing Environments. *Genetics.* **169(4)**: 1807-1814.
- Lezameta, L., Gonzáles-Escalante, E., Tamariz, J. H. 2010. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* **27(3)**: 345-51.
- Lung Li, Y., Tewari, D., Yealy, C.C., Farding, D., M'ikanatha N.M. 2016. Surveillance for travel and domestically acquired multidrug-resistant human *Shigella* infections-Pennsylvania. *Health Secur.* **14(3)**: 143-151.
- McNeill, K., Hamilton, I.R. 2004. Effect of acid stress on the physiology of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* **150**: 735-742.
- MacFaddin, J.F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Panamericana, Tercera Edición, Buenos Aires, Argentina.

- Madigan, M., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Brock Biología de los Microorganismos. Pearson Education, Decima Edición, Madrid, España.
- Mata, L. 1982. Diarrea y disentería por gérmenes invasores. *Gen.* **36(1)**: 41-50.
- Mattar, S., Martínez, P. 2007. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. *Infectio.* **11(1)**: 23-25.
- Merino, L., Hreñuk, G., Ronconi, M., Alonso, J. 2004. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella* spp. en el nordeste argentino. *Rev Panam Salud Publica.* **15(4)**: 219-24.
- MoezArdalan, K., Reza, M., Soltan, M.M., Rezaei, M., Salmanzadeh-Ahrabi, S. 2003. Prevalence and Pattern of Antimicrobial Resistance of *Shigella* species among Patients with Acute Diarrhoea in Karaj, Tehran, Iran. *J Health Popul Nutr.* **21(2)**: 96-102.
- Mora, N., García, A. 2007. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis de grado. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México. Disponible [En línea] en: <https://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/licenciatura/documentos/Susceptibilidad%20de%20bacterias%20acido%20lacticas.pdf> [Consulta: marzo de 2018].
- Morier, D. Encyclopedia Britannica. Antibiotic resistance. 2015. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos. Disponible [En línea] en: <https://global.britannica.com/science/antibiotic-resistance> [Consulta: marzo de 2018]
- Navia, D., Villada, H., Mosquera, S. 2010. Las biopelículas en la industria de alimentos. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. **8(2)**: 118-128.
- Padilla, M.N. Detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* mediante método de Jarlier. *Arch Boliv Med.* **16(84)**: 7-12.
- Passerini, B., Calenda, M., Vay, C., Franco, M. 2007. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from device-associated nosocomial infections. *Rev Argent Microbiol.* **39(4)**:204-212.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 2004. Microbiología. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA, Quinta Edición, Madrid, España.

- Puma, J. 2015. Evaluación del fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas del hospital universitario de Caracas, creciendo en forma libre y formando biopelículas. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Ramos, Y., Alonso, G. 2011. Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes en bacterias aisladas de ambientes naturales. *Rev Soc Ven Microbiol.* **31(2)**: 130-137.
- Riveros, M., Ochoa, T. 2015. Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* **32(1)**:157-64.
- Stewart, P.S., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M. A. 2004. Biofilm Antimicrobial Resistance, p 250-268. *Microbial Biofilms.* ASM Press, Washington, D.C. Disponible [En línea] en: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817718.chap14> [Consulta: marzo de 2018].
- Sánchez-Saldaña, L., Sáenz, E. 2005. Antisépticos y desinfectantes. *Dermatol Peru.* **15(2)**: 82-103.
- Sandra, L. Martínez, A. Valero-Leal, K., Ávila, Y. 2002. Prevalencia y resistencia antimicrobiana de especies de *Shigella* aisladas de niños con diarrea en Maracaibo, Venezuela. *Kasmera.* **30(1)**: 7-16.
- Tijerino, A., Bolaños, H., Acuña, M., Vargas, J., Campos, E. 2016. Emergencia de  $\beta$ -lactamasa AmpC plasmídica del grupo CMY-2 en *Shigella sonnei* y *Salmonella* spp. en Costa Rica, 2003-2015. *Rev Panam Salud Pública.* **40(1)**: 70-75.
- Vélez, N., Díaz, P.L., Rodríguez, C., Bautista, A., Montaña, L.A., Realpe, M.E. Caracterización molecular de aislamientos de *Shigella sonnei* recuperados en el programa de vigilancia por el laboratorio de la enfermedad diarreica aguda en Colombia. *Biomedica.* **35(3)**: 395-406.
- Vicéns, J., Herrate, A., Medina, E. 2005. Análisis de la varianza (ANOVA). Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de economía, Madrid, España. Disponible [En línea] en: <http://docplayer.es/10487925-Analisis-de-la-varianza-anova-jose-vicens-otero-ainhoa-herrarte-sanchez-eva-medina-moral.html> [Consulta: abril de 2018]
- Vignoli, R., Seija, V. 2006. Temas de Bacteriología y Virología Médica. Universidad de la República, Instituto de Higiene, Segunda Edición, Montevideo, Uruguay. Disponible [En línea] en:

<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>

[Consulta: marzo de 2018]

- Villada, J. 2010. Conservadores químicos utilizados en la industria alimentaria. Monografía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México. Disponible [En línea] en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/456/61581s.pdf?sequence=> [Consulta: marzo de 2018].
- Organización Mundial de la Salud. 2015. Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. Disponible [En línea] en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200047/WHO\\_FOS\\_15.02\\_spa.pdf;jsessionid=C7E9334125A0982C8C6C3220D902C761?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200047/WHO_FOS_15.02_spa.pdf;jsessionid=C7E9334125A0982C8C6C3220D902C761?sequence=1) [Consulta: marzo de 2018].
- Wu, F.M., Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Wells, J.G., Mintz, E.D., Swaminathan, B. 2000. Fate of *Shigella sonnei* on Parsley and Methods of Disinfection. *J Food Prot.* **63(5)**: 568-572.