

## Artículo original

# Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales

Yusibeska Ramos, Guillermina Alonso\*

Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Recibido 25 de abril de 2011; aceptado 16 de noviembre de 2011

**Resumen:** Los antisépticos y desinfectantes son utilizados extensivamente para la prevención, vigilancia y control de las infecciones. Entre los más utilizados se encuentran los compuestos catiónicos de amonio cuaternario (QACs). El uso y abuso cotidiano de estos compuestos ha conllevado a la selección de cepas bacterianas resistentes. En este estudio, nos propusimos evaluar la resistencia a agentes desinfectantes en cepas bacterianas, multiresistentes a los antibióticos de uso frecuente, aisladas de ambientes naturales, y bacterias aisladas de pacientes hospitalizados. Se utilizó la prueba de suspensión cuantitativa para evaluar los niveles de resistencia, y ensayos de conjugación bacteriana para examinar la posible asociación de los determinantes de resistencia a moléculas plasmídicas transferibles. Los microorganismos gramnegativos, como *Pseudomonas aeruginosa*, resultaron ser los más resistentes. Las cepas ambientales presentaron niveles mayores de resistencia en comparación con las hospitalarias. Se obtuvieron transconjugantes con niveles de resistencia semejantes a las respectivas cepas donantes, indicando que estos determinantes de resistencia a desinfectantes están codificados en plásmidos, y cuyo análisis por patrones de restricción demostró que existen, al menos, dos moléculas plasmídicas diseminadas entre las cepas del mismo hábitat. Nuestros resultados representan un aporte que permitirá implementar medidas más exitosas para evitar la diseminación de estas bacterias resistentes.

**Palabras clave:** resistencia bacteriana, desinfectantes, conjugación, plásmido.

## Evaluation of resistance to disinfectant agents of bacteria isolated from natural environments

**Abstract:** Antiseptics and disinfectants are widely used for prevention, surveillance and control of infections. Among those most used are quaternary ammonium cationic compounds (QACs). The daily use and abuse of these compounds has resulted in the selection of resistant bacterial strains. In this study we decided to evaluate the resistance to disinfectant agents of bacterial strains multiresistant to frequently used antibiotics, both isolated from natural environments and isolated from hospital patients. The quantitative suspension test was used to evaluate resistance levels, and bacterial conjugation assays to examine the possible association of resistance determinants to transferable plasmid molecules. Gram negative microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa* appeared to be the most resistant. Environmental strains showed higher resistance levels as compared with hospital strains. We obtained transconjugants with resistance levels similar to those of the respective donor strain, indicating that these determinants of resistance to disinfectants are coded in plasmids; when analyzed by restriction patterns they showed that there were at least two plasmid molecules disseminated among the strains of the same habitat. Our results represent a contribution that will allow to implement more successful measures to avoid the dissemination of these resistant bacteria.

**Keywords:** bacterial resistance, disinfectants, conjugation, plasmid.

\* Correspondencia:

E-mail: guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

### Introducción

La resistencia de los microorganismos a múltiples sustancias es un problema de salud pública observado a nivel mundial, en especial después de la aparición y uso

masivo de los antibióticos. Está generalmente aceptado que la causa de este problema ha sido, y todavía es, el extendido e inapropiado uso de los antibióticos en la clínica, la agricultura y en la práctica veterinaria. Del mismo modo, se ha incrementado el uso de otros agentes antimicrobianos,

como los biocidas, que incluyen a los antisépticos y a los desinfectantes [1].

Estos agentes son usados extensivamente en hospitales y centros de salud para una gran variedad de tópicos y aplicaciones, siendo una parte esencial de los programas de control de infecciones, cuyo propósito está abocado a controlar la propagación de infecciones, tanto nosocomiales (en el caso de ambientes hospitalarios) como en la comunidad [2]. En general, biocida es un término que describe un agente químico, de origen sintético o semisintético, que, a ciertas concentraciones críticas y bajo condiciones definidas, puede inactivar o destruir células vivas de microorganismos, en tiempos específicos [3]. Los biocidas, de acuerdo a su blanco de acción, han sido clasificados en preservativos, esterilizantes, antisépticos y desinfectantes [4]. Estos últimos son productos químicos capaces de inhibir o destruir los microorganismos presentes sobre objetos inanimados y/o superficies [5]. Los antisépticos y desinfectantes constituyen la primera línea de defensa para evitar la diseminación de patógenos resistentes. Entre estos agentes se encuentran un grupo de compuestos que ha tenido gran auge en la actualidad, frecuentemente utilizados en los centros hospitalarios; estos son los agentes iónicos y anfóteros, que tienen la propiedad de lesionar la integridad de la membrana celular [6], tales como los compuestos de amonio cuaternario (QAC), como el bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio, agente activo de la mayoría de los desinfectantes utilizados en los centros hospitalarios a nivel nacional. Este tipo de agentes se caracterizan por no presentar olor, son de pH neutro, solubles en agua, de acción polivalente, soportan cambios de temperatura sin alterar su estructura, no son inflamables ni emiten vapores, son inalterables por la luz solar, se mantienen estables a temperatura ambiente y no necesitan de recipientes ni de almacenamientos especiales [7].

Debido a todas las propiedades que poseen estos compuestos y los biocidas en general, existe la tendencia al aumento en el uso de estos agentes en las medidas de control contra las infecciones de origen bacteriano, además de su uso cotidiano y habitual, lo cual ha conllevado a la selección de cepas bacterianas resistentes [8]. Una bacteria puede resistir a la acción de los biocidas y los antibióticos mediante una propiedad natural (resistencia intrínseca), o una propiedad adquirida, por mutación o por la adquisición de plásmidos, transposones o integrones [9]. El mecanismo de resistencia a los desinfectantes que generalmente está codificado en plásmidos es el mediado por bombas de eflujo [6,8]. Se ha reportado que las reducciones en la susceptibilidad de las cepas bacterianas a agentes como el bromuro de etidio, la acriflavina, la cetrimida, el cloruro de benzalconium, y las diaminas, está mediada por plásmidos que codifican para bombas de eflujo, activas también contra compuestos de amonio cuaternario [3].

Existen diversos estudios a nivel internacional sobre aislados clínicos resistentes a los desinfectantes más usados en el área hospitalaria, los cuales reportan bacterias resistentes a múltiples antibióticos con susceptibilidad

disminuida a diferentes desinfectantes [3,10,11]. Igualmente, distintos reportes describen el incremento en la resistencia a desinfectantes en bacterias de origen ambiental, destacando la importancia de caracterizar la calidad del agua, no sólo aquella destinada al consumo humano, sino también en aquellas de uso agropecuario y de recreación [12-16]. Una conclusión alcanzada en todos estos estudios, es la recomendación que en cada país o región se adquiera la experiencia necesaria a través de estudios propios de sus ambientes acuáticos.

En nuestro país, como en el resto de América Latina y el mundo, ocurren problemas de resistencia microbiana. A pesar de esto, son muy pocos los estudios que se han realizado en el ámbito nacional, con la finalidad de demostrar la naturaleza de los determinantes de resistencia a los desinfectantes y la ubicación genética de los genes que codifican estas resistencias. En este trabajo nos propusimos estudiar la capacidad de resistencia bacteriana a uno de los desinfectantes de mayor auge en la actualidad, cuyo ingrediente activo es el bromuro de lauril dimetil bencil amonio (Br-C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>N), con acción polivalente, germicida, destinado a la desinfección en su concepto más amplio, de áreas, infraestructuras, mobiliarios, equipos e instrumentos que así lo requieran, comparando con la resistencia a otro desinfectante cuyo agente activo es polimetilendiurea ([CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), una base fuerte de amplio espectro antimicrobiano. Se evaluó la resistencia a estos agentes en aislados bacterianos provenientes de ambientes acuáticos naturales venezolanos y de pacientes con infecciones nosocomiales, analizando también la posibilidad de que esta resistencia pueda estar codificada en moléculas plasmídicas, que puedan diseminarse en el ambiente donde se encuentran.

## **Materiales y métodos**

*Muestras:* Se analizaron muestras bacterianas aisladas previamente del agua del embalse La Mariposa, el cual se encuentra ubicado a 980 m.s.n.m, a 8 km de la ciudad de Caracas, en la carretera Nacional Las Mayas-San Antonio de los Altos (10°24'41"N, 66°33'53"W). El volumen de agua de este embalse es de 4.000.000 de metros cúbicos, cubre un área de 600.000 m<sup>2</sup> y las profundidades máximas y medias son de 20 m y 6,7 m, respectivamente. Actualmente, los afluentes del embalse se encuentran contaminados con materia orgánica, provenientes de las actividades de caseríos, cochineras y viveros que operan en la cuenca de drenaje [17].

La toma de las muestras de agua del embalse, se realizó en botellas estériles de 150-250 cm<sup>3</sup> de capacidad y fueron transportadas al laboratorio. Se sembraron alícuotas en diferentes medios de cultivo, seleccionando varias colonias para su estudio, en base a la morfología y la coloración de las mismas. Los microorganismos aislados fueron sometidos a pruebas bioquímicas manuales y automatizadas para su identificación (Mendoza J, resultados no publicados). Entre las cepas debidamente identificadas tomadas para el presente

estudio, 18 son bacterias gramnegativas pertenecientes a diferentes géneros bacterianos, catalogadas con los siguientes números del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) (865, 868, 863, 869, 867, 866, 864, 860, 1805, 856, 1804, 1839, 1871, 763, 1810, 1854, 1827, 1843) y 9 cepas grampositivas catalogadas con los siguientes números del CVCM (1841, 174, 18401, 1828, 1855, 1859, 1857, 1843, 722) (Tabla 1). También se estudiaron 4 cepas aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Vargas de Caracas (Tabla 1), las cuales fueron utilizadas como cepas controles para comparación con los microorganismos aislados de las muestras de agua del embalse [18]. Todas las cepas se encuentran almacenadas en el CVCM (<http://cvcm.ciens.ucv.ve/>). El crecimiento de las cepas se realizó en el medio Luria Bertani (LB) en forma de caldo y agar, por 18 h a 37 °C. Todos los aislados utilizados presentaron resistencia a más de un antibiótico, con predominancia de resistencia a la ampicilina.

*Pruebas de susceptibilidad:* Se evaluaron tres tipos de desinfectantes comerciales, dos de ellos pertenecientes a la familia de los QACs y cuyo agente activo es el bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio, en una concentración del 10% y 0,16%, respectivamente y un tercer desinfectante cuyo agente activo es la polimetilendiurea al 5%.

La determinación de la susceptibilidad o resistencia de las cepas bacterianas a los diferentes agentes desinfectantes evaluados, se realizó mediante la Prueba de la Suspensión Cuantitativa, recomendada por la Association of Official Analytical Chemists [19]. Brevemente: a partir de una colonia previamente aislada se inocularon 2 mL de medio LB y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación. Se mezclaron 100 µL del cultivo de cada cepa con 900 µL de desinfectante sin diluir, y al término de 1, 2 y 5 minutos se transfirieron 20 µL de esta mezcla a 1980 µL de solución neutralizante. Se dejó en reposo durante 5 minutos y al término del tiempo se procedió a realizar diluciones seriadas en solución neutralizante (desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$ ). Se sembraron las diluciones y la mezcla sin diluir, en placas de LB agar suplementadas con el antibiótico al cual la cepa presentó resistencia. Los antibióticos ensayados fueron ampicilina, amikacina, ácido nalidíxico, estreptomycin, rifampicina, tetraciclina, kanamicina y cloranfenicol. Todas las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Se calculó el número de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) tanto del inóculo inicial como después de la incubación con los desinfectantes ensayados, cuantificando las colonias en aquellas placas que contenían recuentos mayores de 10 y menores de 500 UFC/mL, tomando en cuenta la dilución sembrada. Se calculó el  $\log_{10}$  de reducción de viabilidad =  $\log_{10}$  de UFC/mL antes de la acción del desinfectante menos  $\log_{10}$  de UFC/mL después de la acción del desinfectante. Se consideraron sensibles aquellas cepas que presentaron  $>5 \log_{10}$  de reducción de viabilidad a los 5 min de exposición. Los ensayos fueron realizados por triplicado. La solución neutralizante utilizada fue el caldo Lethen modificado (peptona de carne 10 g, extracto de

carne 5 g, extracto de levadura 2 g, lecitina de soya 0,7 g, cloruro de sodio 5g, 0,1 g de bisulfito de sodio y 5 mL de Tween 80). Este medio tiene la capacidad de neutralizar desinfectantes, debido a la presencia de la lecitina de soya y del bisulfito de sodio que, además de aportar nutrientes al medio de cultivo, actúan como agentes emulsificantes que neutralizan los compuestos de amonio cuaternario [20].

*Control de neutralización:* Para comprobar que el neutralizante lograba detener la acción del desinfectante utilizado, se mezclaron 100 µL de solución desinfectante con 1800 µL de neutralizante; posteriormente se añadieron 100 µL de una suspensión bacteriana sensible al efecto del agente y se incubó esta mezcla durante 30 min a temperatura ambiente.

*Control de toxicidad del neutralizante:* Para comprobar que el neutralizante no era tóxico para las distintas cepas bacterianas utilizadas, se tomaron 200 µL de cada suspensión bacteriana y se transfirieron a 2 mL de solución neutralizante durante cinco minutos.

De ambos ensayos control, se sembraron diluciones seriadas para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias y se compararon con el inóculo inicial. Un ensayo se consideró válido cuando no hubo disminución de la viabilidad bacteriana [19].

*Conjugación bacteriana:* Para los ensayos de conjugación bacteriana, se utilizaron como células donantes, los aislados gramnegativos que resultaron resistentes a los desinfectantes que contienen QACs. Como cepa receptora se utilizó la cepa de *E. coli* J62-2 (CVCM 131) de genotipo: F-, RIF+, *his*-, *lac*-, *pro*- *trip*-, sensible a la acción de estos desinfectantes y que carece de plásmidos [21]. Brevemente, cada cepa tanto las donantes como la receptora, se inocularon en 2 mL de LB, y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación constante. Posteriormente, se transfirió una alícuota de 0,2 mL de cada una (donante y receptora), a recipientes estériles que contenían 9,8 mL de LB, y se determinó, por medio de un fotocolorímetro, la cantidad inicial de bacterias en cada uno de los inóculos. Una vez alcanzadas 60 Unidades Klett (UK) por la receptora, y 80 UK por la donante, se tomó una alícuota de 0,1 mL de la cepa donante y 0,4 mL de la cepa receptora, y se mezclaron en un tubo que contenía 0,5 mL de LB. La mezcla se incubó toda la noche a 37 °C. Se realizaron diluciones seriadas de la mezcla conjugante, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en solución salina (NaCl 0,85%). Se tomaron alícuotas de 100 µL de la mezcla conjugante y de las diluciones para sembrar por rastrilleo en medio selectivo para las transconjugantes (RIF-AMP).

*Aislamiento del ADN plasmídico:* Se realizó el aislamiento del ADN plasmídico a las cepas transconjugantes utilizando el método de lisis alcalina descrito previamente [22].

*Patrón de restricción de las moléculas plasmídicas:* Se analizaron los patrones de bandas generados por las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* (Invitrogen). El ADN digerido fue visualizado utilizando electroforesis en geles de agarosa

Tabla 1. Resultados de las pruebas de resistencia de los aislados clínicos (V) y ambientales (M) con desinfectantes cuyo agente activo es QACs o polimetilidurea.

Cepa	Género o especie	No. de pruebas	Fenotipo QACs	Fenotipo polimetilidurea	Clasificación
M1	<i>Escherichia coli</i> cepa 1	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
M2	<i>Escherichia coli</i> cepa 2	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
M3	<i>Serratia</i> sp.	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
M4	<i>Aeromonas sobria</i>	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
M5	<i>Morganella morganii</i>	6	Resistente	Sensible	gramnegativa
M6	<i>Citrobacter freundii</i>	6	Resistente	Sensible	gramnegativa
M7	<i>Escherichia fergusonii</i>	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
M8	<i>Enterobacter</i> sp.	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
M9	<i>Brevundimona vesicularis</i> 1	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
M10	<i>Brevundimona vesicularis</i> 2	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
M12	<i>Aeromonas hydrophila</i>	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
M23	<i>Escherichia coli</i> cepa 3	6	Resistente	Sensible	gramnegativa
M26	<i>Shewanella putrefaciens</i> 1	6	Resistente	Sensible	gramnegativa
M27	<i>Shewanella putrefaciens</i> 2	6	Resistente	Sensible	gramnegativa
M29	<i>Escherichia coli</i>	6	Resistente	Sensible	gramnegativa
M34	<i>Aeromonas sobria</i>	6	Resistente	Sensible	gramnegativa
M40	<i>Escherichia coli</i>	6	Resistente	Sensible	gramnegativa
M43	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	Resistente	Resistente	gramnegativa
J622	<i>Escherichia coli</i>	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
V109	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
V110	<i>Escherichia coli</i>	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
V111	<i>Escherichia coli</i>	6	Sensible	Sensible	gramnegativa
V112	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	Resistente	Sensible	gramnegativa
M14	<i>Bacillus</i> sp.	6	Resistente	Resistente	grampositiva
M20	<i>Corynebacterium</i> sp. cepa 2	6	Sensible	Sensible	grampositiva
M24	<i>Bacillus</i> sp. cepa 3	6	Resistente	Resistente	grampositiva
M28	<i>Bacillus</i> sp. cepa 5	6	Resistente	Resistente	grampositiva
M35	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	6	Resistente	Sensible	grampositiva
M37	<i>Micrococcus</i> sp.	6	Resistente	Resistente	grampositiva
M38	<i>Staphylococcus</i> sp.	6	Resistente	Resistente	grampositiva
M39	<i>Bacillus mycoides</i>	6	Resistente	Resistente	grampositiva
M42	<i>Micrococcus</i> sp.	6	Resistente	Resistente	grampositiva

La primera columna representa la denominación de la cepa. El número de pruebas indica el número de veces que se realizó la prueba con cada cepa. Se utilizó la cepa de referencia *E. coli* J622, como control de susceptibilidad.

0,8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 0,089M, ácido bórico 0,089M, EDTA 0,002M, pH 8,0). La visualización del ADN se realizó con bromuro de etidio.

## Resultados

Los resultados de la resistencia bacteriana a los desinfectantes ensayados se muestran en la tabla 1. En todos los ensayos el control de toxicidad del neutralizante y el control de neutralización mostraron validez de los resultados.

Según los resultados, de las 32 cepas utilizadas para la

realización de este ensayo, 18 resultaron ser resistentes a la acción del compuesto de amonio cuaternario utilizado, y las 14 cepas restantes reflejaron ser sensibles. De las 23 cepas de bacterias gramnegativas evaluadas, 10 resultaron ser resistentes. En el caso de las grampositivas, de las 9 cepas evaluadas, sólo una resultó ser sensible (M20), y el resto presentó resistencia al desinfectante a la concentración y tiempo de exposición utilizado. Los patrones de resistencia en las distintas cepas evaluadas, se mantuvieron iguales con los dos desinfectantes cuyo agente activo es un QAC, demostrando que el fenotipo de resistencia se mantiene independientemente de la concentración del compuesto

activo del desinfectante comercial. Al evaluar estas mismas cepas con el desinfectante cuyo agente activo es la polimetilendiurea al 5%, sólo una cepa gramnegativa perteneciente al género *Pseudomonas* fue resistente. De todos estos resultados, se debe destacar que las cepas grampositivas fueron resistentes a los tres desinfectantes evaluados, excepto las del género *Corynebacterium*.

En general, entre las cepas aisladas de muestras de agua del embalse se encontró un mayor porcentaje de resistencia, visualizado como un mayor número de colonias a los diferentes tiempos ensayados, en comparación con los aislados bacterianos de muestras clínicas.

Al evaluar la presencia de plásmidos en las 10 cepas de bacterias gramnegativas que fueron resistentes a desinfectantes con compuestos de amonio cuaternario, se encontró que todas las cepas resistentes presentan más de una molécula plasmídica (resultados no mostrados), por lo que se utilizaron como donantes para los ensayos de conjugación bacteriana. Bajo las condiciones utilizadas, fueron exitosos los ensayos de transferencia con ocho de las cepas y el patrón de plásmidos de las respectivas transconjugantes se muestra en la figura 1, evidenciándose la transferencia de más de una molécula extracromosomal.

plásmidos entre las cepas del reservorio de agua, ya que su análisis permite observar posibles similitudes, discriminar entre diferentes moléculas y establecer relaciones entre plásmidos de un mismo origen. Para analizar los plásmidos encontrados en las transconjugantes, se procedió a digerir enzimáticamente el ADN plasmídico de cada cepa, utilizando 2 enzimas diferentes. Al analizar el patrón de digestión del ADN plasmídico de las transconjugantes TM562, TM662, TM2962, TM3462 y TM4062, se encontraron patrones de bandas iguales, con las dos enzimas utilizadas, lo que permite sugerir que estas transconjugantes, y sus respectivas donantes, comparten los mismos plásmidos, que codifican la resistencia al antibiótico ampicilina y al bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio (Figura 2).

## Discusión

En Venezuela son muy pocos los estudios que caracterizan microbiológicamente los embalses, ríos y lagos u otros cuerpos de agua del país. De hecho, son aun más reducidos los estudios enfocados a la caracterización de los microorganismos que habitan en este tipo de ambientes, la resistencia que puedan presentar éstos a los diversos

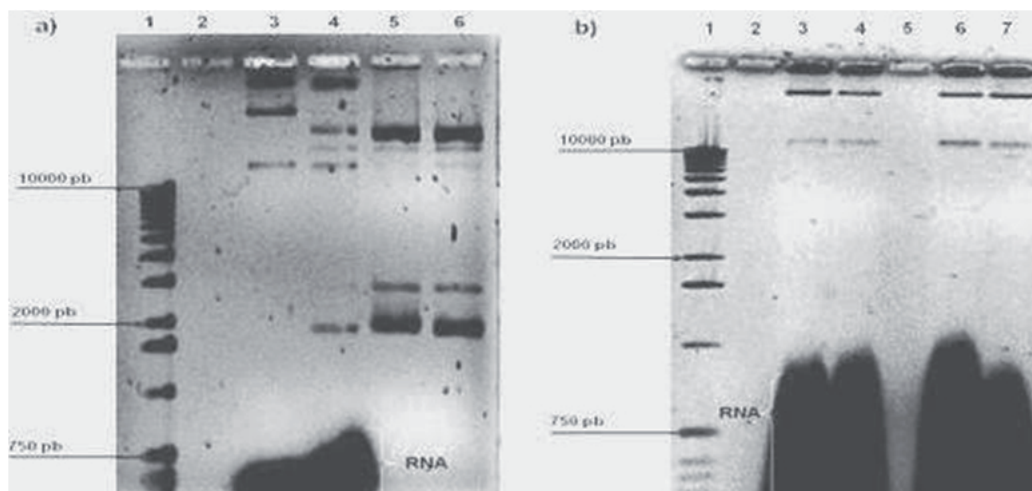


Figura 1. Registro fotográfico de la corrida electroforética del aislamiento del ADN plasmídico de cepas transconjugantes. a) Carril 1: MP marcador de peso molecular 1kb. Carril 3: TM662. Carril 4: TM2362. Carril 5: TM2662. Carril 6: TM2762. b) Carril 1: MP marcador de peso molecular 1kb. Carril 3: TM2962. Carril 4: TM4062. Carril 6: TM3462. Carril 7: TM562.

Al analizar la capacidad de las cepas transconjugantes de resistir el efecto de los desinfectantes ensayados, se encontró que todas las transconjugantes analizadas adquirieron la resistencia tanto al antibiótico ampicilina (marcador de selección de la conjugación) como al bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio, evidenciado en el crecimiento de colonias resistentes a la acción del desinfectante al ser evaluadas mediante la prueba de suspensión cuantitativa.

Una manera sencilla, eficiente y confiable para caracterizar los plásmidos que se encuentran en cepas bacterianas es mediante el uso de endonucleasas de restricción, generando un patrón determinado, único y característico para cada molécula. Estos patrones de restricción (*fingerprints*) proporcionan información acerca de la diseminación de los

antimicrobianos utilizados comúnmente (antibióticos, metales pesados, biocidas), y cómo ocurre la dispersión de estos determinantes de resistencia.

Para evaluar el panorama de la resistencia a los desinfectantes en aislados bacterianos de nuestro país, se estudió la resistencia a tres desinfectantes comerciales utilizados mayoritariamente en nuestros centros hospitalarios. Los resultados demuestran que el 56% de las cepas evaluadas es resistente a los desinfectantes cuyos agentes activos son compuestos de amonio cuaternario. La resistencia a estos compuestos puede ser alcanzada a través de las diversas estrategias que poseen los microorganismos para resistir a la acción de los biocidas. La estrategia más usada por las bacterias gramnegativas para alcanzar

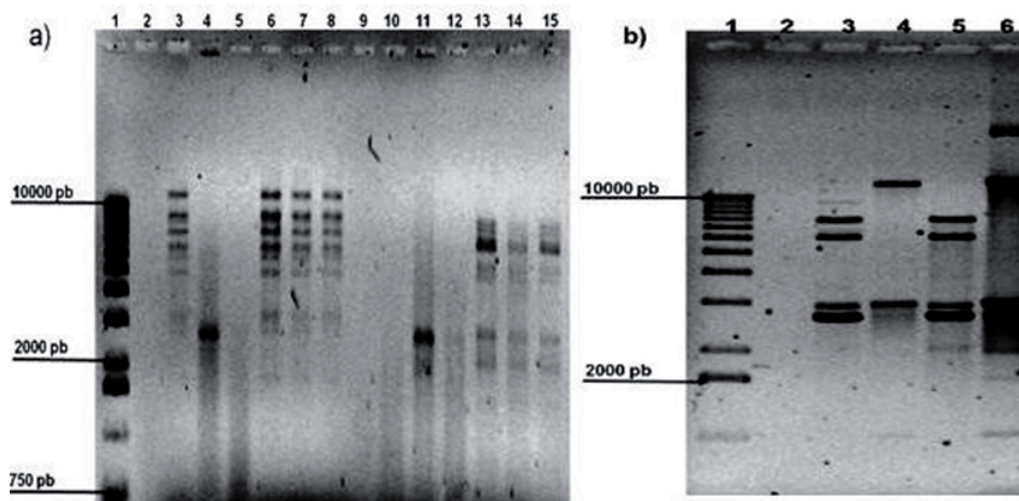


Figura 2. Registro fotográfico del patrón de restricción obtenido por la digestión del ADN plasmídico de las transconjugantes con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. a) ADN plasmídico de las transconjugantes tratado con las enzimas *EcoRI* (carriles 3 al 8) y *PstI* (carriles 10 al 15). Carril 1: MP marcador de peso molecular 1Kb. Carril 3: TM562. Carril 4: TM2662. Carril 5: TM2762. Carril 6: TM2962. Carril 7: TM3462. Carril 8: TM4062 digeridas con *EcoRI*. Carril 10: TM562 digerida con *PstI*. Carril 11: TM2662 digerida con *PstI*. Carril 12: TM2762 digerida con *PstI*. Carril 13: TM2962 digerida con *PstI*. Carril 14: TM3462 digerida con *PstI*. Carril 15: TM4062 digerida con *PstI*. b) ADN plasmídico de las transconjugantes TM2662 y TM2762 tratado con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb. Carril 3: TM2762 digerida con *EcoRI*. Carril 4: TM2762 digerida con *PstI*. Carril 5: TM2662 digerida con *EcoRI*. Carril 6: TM2662 digerida con *PstI*.

la resistencia a los biocidas, es la disminución de la acumulación del agente activo dentro del interior celular, y esto lo logran regulando el flujo del paso de este agente a través de la pared celular [8].

Para los aislados grampositivos, se observó que, de las 9 cepas de microorganismos evaluados, ocho resultaron ser resistentes. Ha sido descrito que la resistencia a un biocida en particular, puede ser función de la permeabilidad del mismo a través de la pared celular, y este tipo de bacterias son más permeables, y por lo tanto serían más susceptibles a la acción de estos agentes [1]. Una explicación a los resultados aquí obtenidos es que esta resistencia fue adquirida, y las moléculas plasmídicas son las candidatas potenciales para portar el gen o los genes que codifican para este fenotipo de resistencia.

La resistencia a compuestos de amonio cuaternario codificada por plásmidos ha sido demostrada en los plásmidos relacionados al grupo pSK1, que codifican para las bombas de eflujo que se caracterizan por exportar múltiples agentes no relacionados [9]. Liu *et al*, proponen que la presencia en el ambiente de los compuestos de amonio cuaternario, tales como el bromuro de trimetilamonio y el isetionato de propamidina, todos agentes catiónicos relacionados, actúa como presión selectiva para la retención de los plásmidos que codifican para la resistencia a estos agentes [23]. También se ha demostrado que las moléculas plasmídicas portadoras de estos genes, pueden ser transferidas entre bacterias de diferentes géneros de bacilos grampositivos, como *Micrococcus* y *Bacillus*, sugiriendo un mecanismo de dispersión de esta capacidad de supervivencia.

Por otra parte, el ambiente hospitalario sirve como un reservorio de patógenos nosocomiales con multiresistencia, que surgen como consecuencia del uso inadecuado de los

antimicrobianos en las terapias contra infecciones de origen bacteriano. En este estudio también evaluamos, en cuatro aislados provenientes de pacientes hospitalizados en el Hospital Vargas de Caracas, el fenotipo de resistencia al bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio, con la finalidad de establecer un análisis comparativo entre la resistencia de los aislados de origen hospitalario y los aislados ambientales. Los resultados muestran que de las cuatro cepas ensayadas, sólo una resultó ser resistente a la exposición del desinfectante a los distintos tiempos ensayados. Entre los aislados ambientales se encontró un porcentaje mayor de cepas con el fenotipo de resistencia. Este aumento en la resistencia de los aislados ambientales puede ser atribuido a que el pool genético de los microorganismos en la naturaleza se ha modificado significativamente, como consecuencia del incremento en la producción y uso de antimicrobianos, y de las bajas concentraciones de estos compuestos que se encuentran en el ambiente, favoreciendo el desarrollo de la resistencia a antibióticos y biocidas y la movilidad de los elementos genéticos que codifican para la misma [24]. El incremento de la resistencia a múltiples antimicrobianos en bacterias patógenas e inócuas en los ambientes naturales, ha ido en aumento por la falta de estudios que evalúen los efectos eco tóxicos de la constante presencia de estos agentes en concentraciones sub-inhedoras en los distintos cuerpos de aguas, sedimentos y suelo, facilitándose la selección de distintos genes de resistencia así como la dispersión de los mismos. [25].

Para fines comparativos, se realizó el crecimiento de los cultivos en presencia de un desinfectante libre de compuestos de amonio cuaternario, y cuyo compuesto activo es la polimetilendiurea, que ha demostrado ser altamente eficiente contra organismos gramnegativos. La

acción que ejerce la polimetilendiurea sobre las bacterias es debida a la disociación iónica en iones hidroxilo, inhibiendo las enzimas de la membrana citoplasmática, produciendo una alteración química de los componentes orgánicos y en el transporte de nutrientes, causando un efecto tóxico sobre la célula bacteriana. Los iones hidroxilo son radicales libres altamente oxidantes que muestran una reactividad marcada e indiscriminada [5]. Nuestros resultados concuerdan con lo esperado, ya que sólo una cepa del género *Pseudomonas* fue resistente a la acción de este desinfectante. Los microorganismos pertenecientes a este género presentan características especiales en la composición de su membrana, con un alto contenido de magnesio, mostrando una fuerte interacción entre los enlaces de los lipopolisacáridos, generando una barrera prácticamente impermeable, y además, presentan porinas con un tamaño reducido, que no permiten la difusión general a través de ellas [26]. Para los demás microorganismos clasificados como grampositivos, nuestros resultados muestran que de las 9 cepas analizadas 7 resultaron ser resistentes a la concentración de polimetilendiurea utilizada. Las dos cepas que presentaron susceptibilidad, pertenecían al género *Corynebacterium*, las cuales también fueron sensibles al compuesto de amonio cuaternario. Estos resultados nos permiten ratificar que los microorganismos del género *Corynebacterium* analizados en este estudio exhiben fenotipo de susceptibilidad a la acción de los antisépticos y desinfectantes ensayados, disponibles en el mercado venezolano.

En la literatura no existen reportes previos que permitan explicar la resistencia de estos 7 aislados de bacterias grampositivas a la polimetilendiurea. Se podría sugerir que esta resistencia está codificada en los mismos plásmidos que codifican la resistencia a compuestos de amonio cuaternario, y que el mecanismo que genera el fenotipo de resistencia sea por bombas de eflujo, que eliminen eficientemente los compuestos del interior celular.

Las cepas resistentes que fueron exitosas en la transferencia del material genético, bajo las condiciones ensayadas, fueron identificadas como: *Escherichia coli* (M23, M29, y M40), *Morganella morganii* (M5), *Aeromonas hydrophila* (M34), *Shewanella putrefaciens* (M26 y M27), *Citrobacter freundii* (M6) y *Klebsiella pneumoniae* (V112), y dado que todas las transconjugantes adquirieron la resistencia al bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio, se demostró que esta resistencia, independientemente del mecanismo expresado, se encuentra asociada a moléculas plasmídicas movilizables. Al analizar los patrones de restricción de las moléculas de las transconjugantes TM562, TM662, TM2962, TM3462, y TM4062 se determinó que son indistinguibles, lo que nos permite sugerir que estas cepas donantes que comparten el mismo hábitat también comparten los mismos plásmidos, en los cuales se encuentra codificada la resistencia al antibiótico ampicilina y al bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio.

Con el protocolo aplicado no se obtuvieron transconjugantes utilizando como donantes las cepas provenientes del ambiente clínico, aun cuando si ha resultado exitoso con otros aislados hospitalarios [22]. Sin embargo, estas cepas,

a diferencia de las ambientales, permanecieron susceptibles a la acción de los desinfectantes ensayados.

En la actualidad, a nivel internacional, se adelantan estudios a nivel microbiológico y epidemiológico en el campo de la resistencia a los agentes desinfectantes. En general se recomienda no diluir estos productos durante el proceso de limpieza y dejarlos actuar el tiempo necesario. Sin embargo, y cada vez con más frecuencia, estos productos se utilizan de forma inadecuada, no sólo en los centros de salud, sino también en entornos domésticos, ocasionando que las bacterias puedan sobrevivir y hacerse tolerantes a los productos. En nuestro país se hace necesaria la realización de estudios abocados, no sólo a determinar los porcentajes y los niveles de resistencia de los aislados bacterianos a los antibióticos, sino también a evaluar la resistencia a los desinfectantes que son comúnmente utilizados. Nuestros resultados representan un primer aporte en este sentido, que permitirá implementar medidas más exitosas que conlleven a evitar diseminación de estas bacterias resistentes.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) a GA (PG-03-7327).

### Referencias

1. SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. 2009.
2. Becerra G, Plascencia A, Luevanos A, Domínguez M, Hernández I. Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enf Inf Microbiol*. 2009; 29:70-6.
3. Gilbert P, McBain JA. Potential impacts of increased use of biocide in consumer products on prevalence of antibiotics resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16:189-208.
4. Maillard JY. Bacterial resistance to biocides in the health care environment: should it be of genuine concern? *J Hosp Infect*. 2007; 65(Suppl 2):60-72.
5. McDonnell G, Russell, DA. Antiseptics and disinfectants: activity, action and assistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12:147-79.
6. Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. Development of bacterial resistance to several biocide and effects on antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect*. 2003; 55:98-107.
7. Hugo WB. Disinfection mechanism. In Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GA. Principles and practice of disinfection, preservation, and sterilization. Third edition. Oxford, England: Blackwell Science; 1999. p. 258-72.
8. Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3:794-802.
9. Sheldon AT. Antiseptic "Resistance": real or perceived threat. *Clin Infect Dis*. 2005; 40:1650-6.
10. Taylor H, Rogers J, Holah T. A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 °C. *J App Microbiol*. 1999; 87:718-25.

11. Smith K, Hunter L. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol.* 2008; 57:966-73.
12. Moore L, Ledder R, Gilbert P, McBain A. *In vitro* study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *App Environment Microbiol.* 2008; 15:4825-34.
13. Alonso G, Narvaez P, Toba F, Gomes C, Pedroza R, Rodríguez-Lemonie V. Caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes venezolanos. *Mem Inst Biol Exp.* 2001; 3:93-6.
14. Alonso G, Malaver E, Guzmán M, Rodríguez-Lemoine V. Caracterización de plásmidos e integrones presentes en bacterias multiresistentes aisladas en diferentes ambientes de Venezuela. *Mem Inst Biol Exp.* 2005; 4:81-4.
15. Toba A. Caracterización de plásmidos bacterianos de cepas aisladas del embalse Pao-Cachinche. Trabajo especial de grado de la licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2000.
16. Mendoza J. Variaciones en la abundancia del plancton y de las bacterias en el embalse La Mariposa (Dpto. Federal, Venezuela) período Noviembre 1998-Mayo 1999. Trabajo especial de grado de la licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 1999.
17. Gonzalez E, Ortaz M. Efectos del enriquecimiento con N y P sobre la comunidad del fitoplancton en microcosmos de un embalse tropical (La Mariposa, Venezuela). *Rev Biol Trop.* 1998; 46:27-34.
18. Rivas J, Redondo C, Alonso G. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Act Cient Soc Venez Bioanal Espec.* 2006; 9:3-7.
19. Anon. BS EN 1276. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements (Phase 2, Step 1) London: British Standards Institution 1997.
20. FDA Bacteriological Analytical Manual (BMA). Microbiological methods for cosmetics, Lethen Agar (modified), Lethen Broth (modified). 1995.
21. Guariglia V, Rizzolo K, Ramos Y, Alonso G. Estudios de los determinantes de resistencia y de las propiedades conjugativas de los plásmidos presentes en aislados bacterianos venezolanos. *Mem Inst Biol Exp.* 2008; 5:101-4.
22. Redondo C, Alonso G. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multiresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2007; 27:100-7.
23. Liu Q, Liu M, Wu Q, Li C, Zhou T, Ni T. Sensitivities to biocides and distribution of biocides resistance genes in quaternary ammonium compound tolerant *Staphylococcus aureus* isolated in a teaching hospital. *Scand J Infect Dis.* 2009; 4:403-9.
24. Lösch L, Merino L, Alonso J. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco. *Com Cient Tec* 2005; 14:1-4.
25. Kümmerer K. Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54:311-20.
26. Russell AD. Mechanism of bacterial insusceptibility to biocides. *Am J Infect Control.* 2001; 29:259-61.