



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ACCIÓN DE DIVERSOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LA BIOPELÍCULA PRODUCIDA
POR *Escherichia coli* UROPATÓGENA

**Línea de investigación:
Microbiología, parasitología e inmunología**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora

Chavez Abad, Cynthia Lucy

Asesor

Salas Ascencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado

Sáez Flores, Gloria María

Velarde Vílchez, Mónica Margarita

Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima - Perú

2022



Document Information

Analyzed document	1A_Chavez_Abad_Cynthia_Lucy_Titulo_Profesional_2022.docx (D125814106)
Submitted	2022-01-22T18:12:00.0000000
Submitted by	BONIFACIO ALAVI
Submitter email	balavi@unfv.edu.pe
Similarity	1%
Analysis address	balavi.unfv@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3681638/ Fetched: 2020-10-27T08:49:47.6900000	 1
SA	Universidad Nacional Federico Villarreal / 1A_HUILLCA_MIRANDA_IRMA_ALEXANDRA_TITULO_PROFESIONAL_2019.docx Document 1A_HUILLCA_MIRANDA_IRMA_ALEXANDRA_TITULO_PROFESIONAL_2019.docx (D53864905) Submitted by: repositorio.vrin@unfv.edu.pe Receiver: repositorio.vrin.unfv@analysis.arkund.com	 1
W	URL: https://www.redalyc.org/journal/2390/239047318005/html/ Fetched: 2021-07-17T04:31:18.3230000	 2



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ACCIÓN DE DIVERSOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LA BIOPELÍCULA

PRODUCIDA POR *Escherichia coli* UROPATÓGENA

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Chavez Abad, Cynthia Lucy

Asesores:

Salas Ascencio, Ramsés
ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado:

Sáez Flores, Gloria María
Velarde Vílchez, Mónica Margarita
Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima – Perú

2022

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi mamá, Isabel Abad, por darme la mejor herencia de vida, una carrera profesional y a mi papá, Jorge Chavez, por ser mi apoyo y compañía en cada noche de estudio.

Ambos fueron mi soporte de constante perseverancia para culminar la tesis. Además de ser mi razón y motivo para seguir adelante. Así como a mi esposo Luis Prado, por alentarme día a día para finalizar con esta significativa etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

A mis asesoras externas, las Dras. Coralith García y Fiorella Krapp así como a mi asesora de metodología, Mg. Noemí Hinostroza por el tiempo, consejos y constantes asesorías indicándome siempre que todo lo que se inicia debe culminarse de la mejor manera posible.

A mi asesor, Mg. Ramsés Salas, por el seguimiento del desarrollo de tesis, palabras de motivación y ayuda, durante todo este tiempo como Tesista.

A la Dra. Paola Scavone, del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, quien de manera profesional y amable me ayudó con las interrogantes que tuve durante el proceso de estandarización de la técnica para detección de biopelículas.

Finalmente, a la Fundación Instituto Hipólito Unánue, por la oportunidad de apoyar económicamente proyectos de investigación, siendo este trabajo, uno de los ganadores en el concurso de “Contribución económica para la Investigación Científica”.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Descripción y formulación del problema.....	11
1.2 Antecedentes.....	12
1.3 Objetivos.....	16
1.3.1 <i>Objetivo general</i>	16
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	16
1.4 Justificación.....	17
1.5 Hipótesis.....	18
II. MARCO TEÓRICO.....	19
2.1 Infección del tracto urinario.....	19
2.1.1 <i>Concepto</i>	19
2.1.2 <i>Epidemiología</i>	19
2.1.3 <i>Etiología</i>	20
2.1.4 <i>Tratamiento</i>	20
2.2 <i>Escherichia coli</i>	21
2.2.1 <i>Concepto</i>	21
2.2.2 <i>Características microbiológicas</i>	21
2.2.3 <i>Escherichia coli uropatógena</i>	22
2.2.3.1 <i>Concepto</i>	22
2.2.3.2 <i>Patogénesis</i>	22
2.2.3.3 <i>Factores de virulencia de Escherichia coli uropatógena</i>	22
2.3 Biopelículas.....	25
2.3.1 <i>Concepto</i>	25
2.3.2 <i>Biosíntesis de la biopelícula</i>	26
2.3.3 <i>Factores de resistencia antibiótica en biopelículas</i>	28
2.3.4 <i>Detección de biopelículas</i>	30
2.4 Susceptibilidad antibiótica.....	30

2.4.1	<i>Aminoglucósidos</i>	31
2.4.2	<i>Betalactámicos</i>	32
2.4.3	<i>Quinolonas</i>	33
2.4.4	<i>Fosfomicina</i>	35
III.	MÉTODO	37
3.1	Tipo de investigación	37
3.2	Ámbito temporal y espacial	37
3.3	Variables	37
3.4	Población y muestra	37
3.4.1	<i>Cepas para la evaluación de formación de biopelículas</i>	38
3.4.2	<i>Cepas para la evaluación de la acción de los antibióticos sobre la formación de biopelículas</i>	38
3.5	Instrumentos	38
3.5.1	<i>Materiales</i>	38
3.5.2	<i>Equipos</i>	39
3.6	Procedimientos	39
3.6.1	<i>Estandarización de la técnica en placa de microtitulación de 96 pocillos con tinción Cristal Violeta para producción de biopelículas.</i>	39
3.6.1.1	Selección de la cepa control, reactivación y criopreservación de las cepas en estudio.	39
3.6.1.2	Selección de medio de cultivo	40
3.6.1.3	Determinación del tiempo de incubación y cantidad de inóculo	41
3.6.1.3.1	Evaluación con curvas de crecimiento	41
3.6.1.3.2	Evaluación con recuentos de colonias.	41
3.6.1.4	Determinación de la tinción, tiempos de lavados y densidad óptica.	42
3.6.2	<i>Determinación del nivel de formación de biopelículas en aislados clínicos</i>	43
3.6.3	<i>Evaluación de la asociación entre los factores demográficos y microbiológicos con la producción de biopelículas</i>	45
3.6.4	<i>Evaluación del efecto de la concentración de los antibióticos sobre las bacterias UPEC formadoras de biopelículas</i>	45
3.6.4.1	Selección de antibióticos y sus concentraciones.	45
3.6.4.2	Preparación de stock de antibióticos.	46

3.6.4.3	Determinación del efecto de la concentración de los antibióticos sobre las cepas formadoras de biopelículas.....	47
3.7	Análisis estadístico.....	48
IV.	RESULTADOS	50
4.1	Estandarización de la técnica en placa de microtitulación de 96 pocillos con tinción de cristal violeta para producción de biopelículas.....	50
4.1.1	<i>Determinación del tiempo de incubación y cantidad de inóculo</i>	<i>50</i>
4.2	Determinación del nivel de formación de biopelículas en aislados clínicos	52
4.3	Evaluar la asociación entre los factores demográficos y microbiológicos con la producción de biopelículas	53
4.4	Evaluación del efecto de la concentración de los antibióticos sobre las cepas formadoras de biopelículas	55
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
VI.	CONCLUSIONES	66
VII.	RECOMENDACIONES	67
VIII.	REFERENCIAS	68
IX.	ANEXO A.....	83

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1 Determinación de las densidades de 5 cepas referentes de <i>E. coli</i> para un cultivo de 18 horas.....	51
Tabla 2 Determinación de la cantidad de UFC/mL de la cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922 y DH5alpha para cultivos de 4h y 18h.....	52
Tabla 3 Determinación del nivel de producción de biopelícula para la cepa control <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	53
Tabla 4 Clasificación de la formación de biopelículas en cepas causantes de ITU comunitaria.....	54
Tabla 5 Clasificación de la formación de biopelículas en cepas causantes de ITU comunitaria según factores demográficos y microbiológicos.....	55
Tabla 6 Clasificación de la formación de biopelículas en cepas causantes de ITU comunitaria según sexo.....	55
Tabla 7 Clasificación de la formación de biopelículas en cepas causantes de ITU comunitaria según el fenotipo BLEE y No-BLEE.....	56
Tabla 8 Efecto de diferentes concentraciones de 4 antibióticos sobre la formación de biopelículas en cepas causantes de ITU comunitaria.....	58
Tabla 9 Descripción de los estudios que han evaluado la producción de biopelículas.....	64

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1 Cuantificación de la biopelícula a diferentes concentraciones del antibiótico Amikacina.....	59
Figura 2 Cuantificación de la biopelícula a diferentes concentraciones del antibiótico Ceftriaxona.....	60
Figura 3 Cuantificación de la biopelícula a diferentes concentraciones del antibiótico Ciprofloxacina.....	61
Figura 4 Cuantificación de la biopelícula a diferentes concentraciones del antibiótico Fosfomicina.....	62

RESUMEN

Objetivo: Determinar la acción de diversos antibióticos sobre la biopelícula producida por UPEC.

Método: Se estudiaron 137 cepas de *Escherichia coli* que causaron ITU, aisladas de 2 centros médicos del MINSA del Cono Norte de Lima. Se seleccionaron 45 cepas clasificadas como formadores nivel “moderado” y “fuerte” para la evaluación de la acción de los antibióticos a distintas concentraciones. La evaluación de formación de biopelículas y acción de los antibióticos se trabajó de manera *in vitro* con la técnica en placa de microtitulación de 96 pocillos con tinción cristal violeta. El efecto de la exposición a los diversos antibióticos se evaluó comparando las absorbancias obtenidas para cada tratamiento de un antibiótico mediante ANOVA para medidas repetidas ($p < 0.05$). Si existía significancia entre las absorbancias para cada tratamiento se realizó análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas ($p < 0.05$). **Resultados:** De 124 cepas UPEC evaluadas para formación de biopelícula, 56 (45.2%) no fueron formadoras y 68 (54.8 %) sí, de las cuales 7 (5.7 %) presentaban nivel débil, 13 (10.4 %) nivel moderado y 48 (38.7 %) nivel fuerte de producción de biopelícula. La reducción de biopelículas con los antibióticos evaluados fue significativa con todas las concentraciones utilizadas. **Conclusiones:** Los antibióticos amikacina, ceftriaxona, ciprofloxacino y fosfomicina, incluso en bajas concentraciones, reducen la cantidad de biopelículas generada por la bacteria *E. coli* uropatógena.

Palabras clave: *E. coli* uropatógena, biopelículas, antibióticos.

ABSTRACT

Objective: Determine the action of various antibiotics on the biopelículas produced by UPEC.

Method: 137 strains of *Escherichia coli* that cause UTI, isolated from 2 medical centers of the MINSA of the Northern Cone of Lima. Forty-five strains classified as "moderate" and "strong" level formers were selected for evaluation of the action of antibiotics at different concentrations. The evaluation of biopelículas formation and antibiotic action was carried out *in vitro* using the 96-well microtiter plate technique with crystal violet staining. The effect of exposure to the various antibiotics was evaluated by comparing the absorbances obtained for each antibiotic treatment using ANOVA for repeated measures ($p < 0.05$). If there was significance between the absorbances for each treatment, analysis of variance (ANOVA) was performed for repeated measures ($p < 0.05$). **Results:** Of 124 UPEC strains evaluated for biofilm formation, 56 (45.2%) did not form and 68 (54.8%) did, of which 7 (5.7%) had a weak level, 13 (10.4%) moderate level and 48 (38.7%) strong level of biofilm production. The reduction of biofilms with the antibiotics evaluated was significant with all concentrations used. **Conclusions:** The antibiotics amikacin, ceftriaxone, ciprofloxacin, and fosfomicin, even at low concentrations, reduce the amount of biopelículas generated by uropathogenic *E. coli* bacteria.

Key words: uropathogenic *E. coli*, biofilm, antibiotics.

I. INTRODUCCIÓN

La infección del tracto urinario (ITU) es una enfermedad común en pacientes ambulatorios y es considerada la segunda causa de infección intrahospitalaria (Yábar et al., 2017). El 50 a 80% de la población que sufre esta enfermedad son mujeres jóvenes sexualmente activas (Foxman, 2002 y Nachammai et al., 2016). *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el patotipo causante del 75 a 95% de esta enfermedad (Singer, 2015). Este microorganismo provoca episodios de cistitis aguda no complicada e ITU recurrentes, entre un 50 a 70% y 80 a 90% respectivamente. UPEC posee un importante factor de virulencia, que es la producción de biopelículas, en donde comunidades de microorganismos crecen agregados y rodeados por una matriz extracelular (Wiles et al., 2008; Flores-Mireles et al., 2015; Nachammai et al., 2016 y Casablanca y Hurtado, 2018).

1.1 Descripción y formulación del problema

En los últimos años, el tratamiento para eliminar microorganismos formadores de biopelículas ha sido un gran reto (Ortega-Peña y Hernández-Zamora, 2018). Esto se debe a que UPEC es capaz de invadir el uroepitelio de la vejiga urinaria formando biopelículas que actúan como reservorios bacterianos siendo este hecho considerado como un factor patogenético implicado en el desarrollo de las ITUs (Smithson, 2008). Es por ello, que la erradicación de estas bacterias puede ser más complicada debido a que estos reservorios evaden la respuesta inmune.

Existen diferentes causas que dificultan la eficacia del tratamiento: i) la matriz de exopolisacáridos de las biopelículas pueden albergar enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que destruye la integridad estructural del antibiótico; II) el empleo de diversos factores de virulencia que impiden el paso de las moléculas del antibiótico evitando su reducción;

y III) factores de unión, cuya síntesis es importante para su arquitectura y estabilidad en la zona de invasión (Casablanca y Hurtado, 2018; Bakhtiari y Javadmakoei, 2017).

De esta manera es como las moléculas antimicrobianas disminuyen su velocidad de penetración de la biopelícula a través de la matriz de exopolisacáridos. Con el tiempo, se ha demostrado que la sobrevivencia de este tipo de bacterias después de un tratamiento con antimicrobianos va por encima de las concentraciones inhibitorias mínimas usadas para bacterias suspendidas en cultivos (Caldas-Arias, 2015). Lo que conlleva a que la resistencia antimicrobiana vaya en aumento para fármacos de primera línea usados en el manejo clínico de ITU evitando poderlas eliminar completamente (Lasa et al., 2005; Galván et al., 2016; Lifonzo-Mucha et al., 2018).

Además del incremento de cepas resistentes a antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento como amoxicilina, cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimaxol y quinolonas causando la persistencia de esta bacteria en el tracto urinario, existe una ausencia de métodos estandarizados de uso rutinario para determinar la sensibilidad de las bacterias de una biopelícula a los antimicrobianos (Lasa et al., 2005; Soto, 2014).

Por lo explicado anteriormente, este estudio busca evaluar el efecto de diversos antibióticos utilizados comúnmente para el tratamiento de ITU sobre la formación de biopelícula producida por aislamientos de UPEC por lo que nos orientamos a responder la siguiente pregunta: ¿Cuál es la acción de diversos antibióticos sobre la biopelícula producida por aislamientos de UPEC?

1.2 Antecedentes

La incidencia real de ITU es difícil de establecer, no obstante, la prevalencia de ITU asociada a la comunidad es del 0.7% (Tandogdu y Wagenlehner, 2016). En E.E.U.U., cerca de 7

millones de consultas son solicitadas por ITU, de las cuales 100.000 son por hospitalizaciones para su manejo clínico. En Chile, hay un estimado de 70 mil casos anuales relacionados a estas infecciones. En Perú, no hay una estadística exacta que ayude a saber la incidencia sobre esta enfermedad (Ruíz et al., 2017 y Quispe, 2016). Sin embargo, en el 2016, un total de 5 970 personas fueron reportadas como diagnosticadas con algún tipo de infección intrahospitalaria de los cuales 1 143 pacientes (19%), presentaban infección al tracto urinario (ITU) (Quispe, 2016).

Debido a los constantes casos presentados por esta enfermedad, en los últimos años, distintos autores han realizado estudios para evaluar la formación de biopelículas en cepas UPEC causantes de ITU, así como la acción del antibiótico sobre la misma.

Tapiainen et al. (2013) realizaron en Finlandia un estudio sobre “Formación de biopelícula de *Escherichia coli* y las recurrencias de infecciones del tracto urinario en niños”. En dicho estudio compararon la formación de biopelículas *in vitro* de cepas de UPEC de niños con ITU aguda o recurrente. Estudiaron 206 aislamientos clínicos consecutivos de UPEC de niños con ITU comprobada. Para la formación de biopelículas utilizaron el método de placa de microtitulación cuyos resultados fueron validados por microscopía de barrido láser confocal y microscopía electrónica de barrido. Su principal hallazgo fue que las propiedades de los aislados de UPEC requeridos para el crecimiento efectivo de la biopelícula en una superficie abiótica son importantes para la pielonefritis recurrente, pero no para la cistitis recurrente informando que sería muy valioso estudiar las propiedades de la biopelícula de *E. coli* observadas *in vitro* ya que se obtendría una respuesta clínica más rápida al tratamiento antimicrobiano.

Mittal et al. (2015) realizaron en la India un estudio sobre “*Biopelículas* y resistencia a múltiples fármacos en *Escherichia coli* uropatógena” cuyos objetivos fueron conocer la asociación de varios factores de virulencia y producción de biopelículas en UPEC y determinar el patrón de

susceptibilidad a antibióticos. En su investigación evaluaron 135 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con casos de ITU recurrente. La biopelícula fue detectada mediante el método de placa de microtitulación (MTP). También detectaron diversos factores de virulencia como hemolisina, hemaglutinación, gelatinasa, producción de sideróforos, resistencia sérica e hidrofobicidad. Para el caso de la prueba de susceptibilidad a los antibióticos utilizaron el método de disco difusión de Kirby-Bauer modificado usando el método de difusión en disco para confirmar la producción de BLEE, AmpC, MBL. Su conclusión fue que la producción de biopelículas hace que el organismo sea más resistente a los antibióticos y virulento en comparación con los no productores de biopelículas.

Tadepalli et al. (2016) realizaron en Dubái un estudio sobre “Formación de biopelículas en aislados de *Escherichia coli* uropatógena y su asociación con la producción de betalactamasas de espectro extendido y la resistencia a fármacos” cuyo objetivo es determinar la asociación de la formación de biopelículas, la producción de BLEE y el patrón de susceptibilidad a los antibióticos entre los aislados de UPEC. Su investigación se realizó en 137 aislados de UPEC de casos de ITU. La formación de biopelículas fue detectada mediante el método de placa de microtitulación (MTP) mientras que la producción de BLEE y prueba de susceptibilidad fue por el método de disco difusión de Kirby-Bauer. Como conclusión obtuvieron que la capacidad de formación de biopelículas es mayor entre las cepas de *E. coli* productoras BLEE encontrando una mayor tasa de resistencia entre los productores de biopelículas.

Ortega-Peña y Hernández-Zamora (2018) realizaron en México un estudio sobre “Producción de biopelículas y resistencia antimicrobiana en uropatógenos aislados de catéteres urinarios en un hospital de rehabilitación física”. Determinaron la producción de biopelículas y perfil de susceptibilidad antimicrobiana en 98 uropatógenos aislados de cultivos de orina obtenidos

de pacientes con infección del tracto urinario asociado a catéter. Para ello, usaron el método de placa de microtitulación y disco difusión de Kirby-Bauer, respectivamente. A partir de sus resultados concluyeron que la mayoría de los uropatógenos poseían altos porcentajes de resistencia a distintas familias de antibióticos, y muchos de ellos producen biopelículas en distintos niveles.

González et al. (2018) publicaron en Uruguay un estudio sobre “Efecto de diferentes antibióticos en la biopelícula producida por *Escherichia coli* uropatógena aislada de niños con infección del tracto urinario” cuyo objetivo fue evaluar el efecto de diferentes antibióticos en biopelículas producidas por 116 cepas de UPEC aisladas de niños con ITU correlacionando los factores de virulencia y las comunidades bacterianas intracelulares (IBC) con la formación de biopelículas. En conclusión, el 41% de cepas aisladas de niños con ITU fueron productoras de biopelículas, en las cuales las cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos demostraron ser efectivas para su reducción *in vitro*. No encontraron correlación entre la IB e IBC en las células uroepiteliales formadoras de biopelículas extracelulares.

Casablanca y Hurtado (2018) realizó en Perú el estudio denominado “Asociación entre la formación de *biopelículas* y la producción de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unánue de ENERO - JUNIO 2018”. El objetivo fue determinar la asociación entre la formación del biopelículas y producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Analizaron 190 cepas de *E. coli* aisladas de urocultivos usando el método de Jarlier para demostrar la producción de BLEE y el método en placa de cultivo de tejido (PCT) para demostrar la capacidad de formación de biopelícula. En conclusión, indicaron que existe una asociación significativa entre la producción BLEE y formación de biopelículas. La prevalencia de *E. coli* productor de BLEE en el Hospital Nacional Hipólito Unánue durante enero – junio del 2018 fue del 43%.

Risal et al. (2018) realizaron en Nepal un estudio denominado “Detección de formación de biopelículas por *Escherichia coli* con su perfil antibiograma” cuyo objetivo era encontrar la prevalencia de formación de biopelículas y también el patrón de resistencia a los antimicrobianos de los uropatógenos. Analizaron un total de 50 cepas aisladas para determinar la formación de biopelículas y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos mediante el método de placa de microtitulación y difusión en disco de Kirby-Bauer en agar Mueller Hilton según las directrices de CLSI, respectivamente. Por los resultados obtenidos concluyeron que las cepas formadoras de biopelículas mostraban una mayor resistencia a los antimicrobianos en comparación con las no productoras de biopelículas es por ello por lo que los uropatógenos se deben analizar de forma rutinaria para detectar la formación de biopelículas.

A diferencia de los estudios mencionados anteriormente, nuestro trabajo buscó determinar la acción de diversos antibióticos sobre la biopelícula producida por UPEC en cepas obtenidas de pacientes con ITU en la comunidad cuyo procedimiento se basó en el método de placa de microtitulación de 96 pocillos con tinción Cristal Violeta evaluando un total de 137 cepas para determinar el nivel de formación de biopelícula como no productores, leve, moderado y fuerte. De las cuales, 45 cepas consideradas entre el rango de nivel moderado y fuerte fueron evaluadas para determinar la acción de los antibióticos comúnmente usados en los tratamientos de ITU como amikacina, ceftriaxona, ciprofloxacino y fosfomicina a diferentes concentraciones.

1.3 *Objetivos*

1.3.1 *Objetivo general*

Determinar la acción de diversos antibióticos sobre la biopelícula producida por UPEC.

1.3.2 *Objetivos específicos*

- Estandarizar la técnica para la detección de biopelícula en cepas UPEC.

- Determinar el nivel de formación de biopelículas en cepas UPEC aisladas de 2 centros médicos del MINSA del Cono Norte de Lima.
- Evaluar la asociación entre los factores demográficos y microbiológicos con la producción de biopelículas en cepas UPEC.
- Evaluar el efecto de la concentración de los antibióticos amikacina, ceftriaxona, ciprofloxacino y fosfomicina sobre las biopelículas formadas por cepas UPEC.

1.4 Justificación

En la actualidad, las infecciones causadas por *E. coli* uropatógena constituyen el 80% al 90% de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Son alrededor de 150 millones de personas que desarrollan esta enfermedad cada año (Foxman, 2014 y Flores-Mireles et al., 2015). Por ello es considerada una enfermedad común en la atención ambulatoria y de emergencia en la población por lo que ha sido declarada un problema de salud pública por las complicaciones asociadas y los altos costos que implica el tratamiento (Hinojosa, 2018). Adicionalmente, el alto consumo de antibióticos generado por esta enfermedad contribuye al aumento de la resistencia antimicrobiana (De la Fuente et al., 2015).

Siendo una preocupación mundial actualmente reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Bahamondez-Canas et al., 2019). El Perú es uno de los países de Latinoamérica con más altas frecuencias de resistencia a cefalosporinas de tercera generación consecuencia de la producción de BLEE, reportando en el 2014 una prevalencia de >70% en aislados de *E. coli* (ReLAVRA).

La formación de biopelículas constituye un mecanismo protector que encapsula comunidades bacterianas formando una barrera que limita el paso del antimicrobiano (Tadepalli et al., 2016). Este factor de virulencia podría reducir la eficacia de los antibióticos para la

erradicación completa de UPEC en el tracto urinario y contribuir a la generación de resistencia antibiótica (Robledo et al., 2017).

En la actualidad, los casos de infecciones urinarias causadas por UPEC resistentes son emergentes a nivel de la comunidad. En el Perú, existe poca información sobre la frecuencia de producción de BLEE en aislamientos de uropatógenos de la comunidad, con algunos estudios reportando una frecuencia de 10% (Asmat et al., 2015). Más aún, no existe información sobre la producción de biopelículas en uropatógenos de la comunidad y cómo esta se asocia a la resistencia a diversos antibióticos.

La formación de biopelículas puede dificultar el manejo antimicrobiano de los pacientes, por lo cual el presente trabajo busca evaluar el nivel de formación de biopelículas en las cepas UPEC aisladas de 2 centros de salud del MINSA del Cono Norte de Lima y evaluar el efecto de la concentración de diversos antibióticos sobre la formación de las biopelículas. La información obtenida en este estudio podría contribuir en brindar información que ayude a optimizar el manejo de las infecciones de tracto urinario causado por UPEC.

1.5 Hipótesis

Se requieren altas concentraciones de amikacina, ceftriaxona, ciprofloxacino y fosfomicina para reducir los niveles de biopelícula producida por UPEC.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Infección del tracto urinario*

2.1.1 *Concepto*

La CDC (Centro de control y prevención de enfermedades) define esta enfermedad como un proceso inflamatorio causado por la invasión y multiplicación de bacterias en el sistema urinario (Orrego-Marín et al., 2014).

Esta enfermedad presenta diferentes cuadros clínicos como cistitis en mujeres jóvenes, ITU recurrente, pielonefritis aguda, ITU en hombres, en el adulto mayor, en la embarazada, ITU asociado a sonda vesical, etc. Según localización, las ITUs pueden presentarse en la zona baja (vejiga y uretra) y alta (uréteres, riñones y pélvica renal) del tracto urinario generando o no complicaciones sintomatológicas en el paciente (Delgado, 2019).

2.1.2 *Epidemiología*

La ITU puede ser adquirida por personas de cualquier edad y género, es por ello la alta prevalencia a nivel comunitario y nosocomial (Casablanca y Hurtado, 2018).

En el caso de mujeres sexualmente activas, pueden presentar ITU recurrente entre los 18 a 39 años. Mientras que, de los 15 a 35 años, sufren frecuentemente de cistitis cuya incidencia se muestra en 25 casos por cada 10,000 mujeres (Robledo et al., 2017; Alós, 2005).

En las mujeres embarazadas, la incidencia de ITU es del 5 al 10%. Para el caso de los adultos mayores a 65 años, es considerada la segunda enfermedad más frecuente después de las infecciones respiratorias (Talavera, 2015).

2.1.3 Etiología

Existen diferentes microorganismos que poseen determinantes de virulencia intracelular como extracelular que les permite la fácil adherencia en el huésped provocando infecciones recurrentes y crónicas. En más del 95% de los casos, solo un microorganismo es responsable de generar ITU tanto en hombres como mujeres (Alós, 2005; Echevarría-Zárate et al., 2006; Delcaru et al., 2016).

El principal agente común etiológico en esta enfermedad es *E. coli*, causante del 85% en casos de ITUS adquiridas en la comunidad, 50% en casos nosocomiales, 75 % en ITUs no complicadas y 65% en ITUs complicadas. Sin embargo, dependiendo del estado en que se encuentre el paciente se pueden aislar otros tipos de microorganismos por ejemplo del 20% al 25% se pueden aislar bacterias como *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Alós, 2005; Echevarría-Zárate et al, 2006; Robledo et al., 2017; Guzmán y García-Perdomo, 2019; Delgado, 2019).

2.1.4 Tratamiento

Existen diferentes factores que condicionan el uso del antibiótico para desaparecer la sintomatología y eliminar al microorganismo en el tracto urinario. Entre ellos se encuentran los aspectos farmacocinéticos (alta concentración en la orina ya que esta debe llegar a la capa más profunda de la pared de la vejiga y la próstata o al parénquima renal, en caso de ITU alta), efectos secundarios que pueden causar en la flora intestinal y vaginal y la tolerancia aceptable del paciente ante el fármaco. Dentro de las familias de antibióticos más utilizados para ITUs están los beta-lactámicos y fluoroquinolonas (Piera, 2003; Ixtepan, 2018).

Dependiendo del cuadro clínico que presente el paciente se pueden suministrar antibióticos como ciprofloxacina, levofloxacina, ceftriaxona, cefepime entre otros. Sin embargo, la resistencia que presentan los patógenos ante los antibióticos viene siendo un riesgo para las terapias estándar es por ello por lo que, dentro de los últimos años, la fosfomicina y nitrofurantoína han sido de uso necesario para uropatógenos resistentes a múltiples fármacos (MDR) (Guzmán y García-Perdomo, 2019).

2.2 *Escherichia coli*

2.2.1 *Concepto*

Bacteria Gram negativa que puede originar enfermedades gastrointestinales y enfermedades a nivel del tracto urinario (Robledo et al., 2017).

2.2.2 *Características microbiológicas*

Enterobacteria bacilar cuyo tamaño es de 1,1 – 1,5 μm de diámetro por 2,0-6,0 μm de largo. Productora de catalasa y B-galactosidasa. Fermentadora de glucosa y oxidasa negativo (Robledo et al, 2017; Faleiro, 2009).

Bacteria formadora de exopolisacáridos. Expresa adhesinas, manosa sensible y resistente, que permite reconocer los receptores celulares del epitelio urinario, así como leucocidinas y variabilidad antigénica, que ayuda a la invasión de este (Varela, 2008).

Según criterios clínicos y genéticos, este microorganismo puede ser patógeno comensal, causante de infecciones intrainestinales (IPEC) y de infecciones extraintestinales (ExPEC). En este último grupo, se encuentran la *E. coli* causante de sepsis (SEPEC), *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC) (Guerra y Aguilar, 2005; Huillca, 2019).

2.2.3 *Escherichia coli uropatógena*

2.2.3.1 Concepto. UPEC es un tipo específico de ExPEC, caracterizado por ser un patotipo potencial de *E. coli* capaz de causar enfermedad sobre el aparato urinario. Debido a que aún no se han distinguido los patotipos en las ITUs por *E. coli*, esta denominación se mantiene como empleo común por la localización donde esta bacteria genera la enfermedad o por ser una bacteria aislada de la orina de pacientes con ITU (Merino, 2017).

UPEC posee diferentes factores de virulencia y características que le permite adherirse, adquirir nutrientes especiales, multiplicarse y diseminarse dentro del tracto urinario (Baldiris-Avila et al., 2020).

2.2.3.2 Patogénesis. La gravedad de las infecciones urinarias depende de los diversos factores de virulencia de UPEC y la susceptibilidad del huésped contribuyendo a la colonización e invasión del patógeno en el tracto urinario, la formación de biopelículas y el daño tisular (Vysakh et al., 2018).

La enfermedad se origina con el ingreso de UPEC por la región periuretral donde comienza a generar protección en forma de comunidades bacterianas intracelulares (IBC) causando apoptosis de las células epiteliales de la vejiga generando el aumento de bacterias que expresan fimbrias tipo 1. Aquí es donde la hemolisina daña el epitelio, se vacuolizan las células epiteliales y la toxina Sat daña los glomérulos creando un cuadro de bacteriemia debido a que las cepas logran atravesar el epitelio tubular (Robledo et al., 2017; Faleiro, 2009).

2.2.3.3 Factores de virulencia de *Escherichia coli uropatógena*. UPEC posee diferentes factores de virulencia tanto superficiales como secretados. Los superficiales permiten la adhesión del patógeno en la célula huésped, la invasión celular, la formación de biopelículas y la inducción

de citosinas mientras que los factores de virulencia secretados ayudan a la bacteria a colonizar y persistir en el tracto urinario (Shah et al., 2019; Miranda-Estrada et al., 2017).

La adquisición de estos factores de virulencia se obtiene mediante la transferencia horizontal de genes por medio de transposones, bacteriófagos, islas de patogenicidad (PAIs) y plásmidos. Esto confiere la formación de nuevos nichos, ya que ayudan a la bacteria a aumentar su capacidad de patogenicidad para causar enfermedades (Enríquez, 2013).

2.2.3.3.1 Factores de virulencia superficiales de adherencia y colonización. Son organelos de tipo fimbrial que ayudan a la adherencia de la bacteria en la superficie epitelial representando un paso importante para el inicio de la infección bacteriana. Estas adhesinas contribuyen a la virulencia de diferentes maneras: activando las vías de señalización en células bacterianas, el suministro activo de productos bacterianos en el tejido del huésped y el inicio de la invasión bacteriana (Enríquez, 2013).

- Fimbrias tipo I o Pili tipo I: por su gran capacidad de unión, esta adhesina se ve involucrada en la formación de comunidades bacterianas intracelulares (CBIs) provocando obstrucción en los túbulos renales por la unión entre bacterias que crean comunidades tipo biopelículas (Robledo et al., 2017).

- Fimbria P: se encuentra codificada por un clúster de genes entre ellos el gen *papA* (codifica la subunidad mayor), el gen *papC* (transporte de subunidades al exterior y ensambla la fimbria), el gen *papE* (une el complejo de adhesión *papF-G* a la fimbria), los genes *papF* y *papG* (codifican el complejo de adhesión) y el gen *papH* (ensambla las subunidades y ancla la fimbria). Es la adhesina causante la inflamación local, colonización e invasión en el aparato urinario (Merino, 2017).

- Fimbria S: contribuye a diferenciar las cepas patógenas de *E. coli* y establece la infección en el tracto urinario ya que facilita la diseminación del microorganismo en los tejidos del huésped (Enríquez, 2013; Robledo et al., 2017).

- *Curli*: promueven la formación de biopelículas en las superficies abióticas esto se debe a que facilitan las interacciones iniciales y posteriores entre la superficie y la bacteria. Son colonizadoras del área perineal iniciando la infección de vías urinarias (Enríquez, 2013; Soto, 2014).

- Flagelo: encargado de la motilidad del patógeno e interacción de las cepas de *E. coli* con las células epiteliales (Huillca, 2019).

- Cápsula: cumple función de anticplemento y antifagocitario, evasión del reconocimiento inmune y resistencia sérica (Enríquez, 2013).

- Proteína de Membrana externa: tiene función receptora y de transporte (Enríquez, 2013).

2.2.3.3.2 Factores de virulencia secretados. - Alfa hemolisina (HlyA): Toxina involucrada en enfermedades extraintestinales humanas como las ITU, meningitis, septicemia. Su actividad depende de la concentración celular epitelial de los túbulos proximales renales, si la concentración es mayor, UPEC es capaz de destruir las barreras mucosas, daña las células de respuesta inmune y tener acceso a los nutrientes y reservas de hierro. Es por ello que, las cepas persistentes de UPEC, presentan una alta frecuencia de esta toxina (Robledo et al., 2017).

- Factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1): Toxina activadora de Rho GTPasas causando cambios en el reordenamiento del citoesqueleto de actina. Esto promueve que la bacteria pueda inducirse en las células uroepiteliales dañando la colonización temprana en la vejiga. Reduce la

fagocitosis y actividad antimicrobiana por la inhibición que ejerce sobre los neutrófilos (Robledo et al., 2017).

- Toxina secretada autotrasportadora (SAT): Asociado a cepas causantes de pielonefritis debido a que vacuolizan las células del túbulo renal proximal. Es una toxina que se ubica en las islas de patogenicidad en el cromosoma bacteriano (Merino, 2017).

- Toxina dilatadora citoletal (CDT): Presentes en cepas UPEC. Causan citotoxicidad y detienen el ciclo celular (Enríquez, 2013).

- Lipopolisacáridos (LPS): son ácidos grasos anfipáticos que induce citosinas. Son parte del ciclo de vida de la UPEC durante el proceso de infección provocando respuestas adaptativas e innatas. Otorgan resistencia contra ciertos antibióticos (Aguiniga et al., 2016).

2.3 Biopelículas

2.3.1 Concepto

Conjunto de microorganismos incrustados en una matriz de exopolisacáridos que se acoplan entre sí o sobre una superficie. Su actividad depende del tipo de microorganismo, su constitución genética, la naturaleza del sustrato y el entorno soluble. En 1978, Costerton et al., describió por primera vez la “teoría unificada de la formación de biopelículas bacterianas” (Shakibaie, 2018).

Uno de los factores importantes de las biopelículas es la capacidad de adherencia a las células del tracto urinario causando el aumento de patogenicidad y la resistencia a los antimicrobianos (Davari et al., 2019)

Según Socransky y Haffajee (2002), el proceso de desarrollo de las biopelículas se genera de dos maneras: a partir de una célula planctónica y a partir de otra biopelícula. En el primero, las

bacterias tienen la capacidad de formar estructuras de superficie por adhesión mediante fimbrias y fibrillas realizando expresión de genes. El segundo, se da a partir de células sueltas que fueron desprendidas de otras biopelículas manteniendo sus propiedades iniciales.

Cervantes-Huamán (2017) menciona que las estructuras formadas por las biopelículas son explicadas en los distintos modelos hallados por microscopía. Entre ellos se encuentra el modelo monocapa (modelo continuo que describe biopelículas lisas, planas y homogéneas. Explica las actividades químicas basada en la difusión, presión y efectos físicos de flujo), modelo estructura tridimensional o multicapa (modelo donde describe a las biopelículas como un mosaico heterogéneo con microorganismos aglomerados, soportados por la SPE) y el modelo de champiñón o tulipán (modelo actual que describe a la biopelícula como un tallo tipo pedestal atravesado por canales de agua).

2.3.2 Biosíntesis de la biopelícula

Según Ortega-Peña y Hernández-Zamora (2018) y Robledo et al. (2017), en la formación de biopelículas participan diferentes fuerzas fisicoquímicas, mecanismos genéticos y moleculares que ayudan a regular la biosíntesis de la matriz extracelular. Durante este proceso suceden 4 etapas:

- Fase de adhesión: en esta etapa ocurren dos sub-etapas: la adhesión reversible a la superficie de las bacterias planctónicas y la adhesión irreversible a la superficie. La primera sub-etapa, está conformada por factores no específicos como hidrofobicidad, tensión superficial y fuerzas electrostáticas, así como factores específicos: flagelos, proteínas de membrana externa, fimbrias, LPS y EPS. Suceso reversible en donde las células se desprenden de la superficie cuando hay cambios en las condiciones. Por último, en la segunda sub-etapa, se da después del primer contacto célula- superficie. Para el caso de *E.*

coli, las fimbrias Curli, tipo 1 y el antígeno 43 (proteína que ayuda en las interacciones interbacterianas en el interior de la biopelícula) son los que participan en esta adherencia.

- Fase donde se forma la matriz extracelular y las microcolonias o agregación: aquí la matriz comienza a extenderse o crecer más que en la etapa anterior permitiendo que la biopelícula tome mayor volumen formando varias capas y colonice la superficie. Para el caso de *E. coli*, su matriz está compuesta por poliglucosamina, celulosa y ácido colónico. En esta fase sucede la mayor multiplicación de células adquiriendo forma de microcolonias.
- Fase de maduración: en la tercera fase, las bacterias agregadas empiezan a multiplicarse debido a que hay una excesiva producción de exopolisacáridos, liberación de ADN extracelular y proteínas. De esta manera es como forman una estructura tridimensional y compleja, tipo “hongo”, donde se genera un gradiente rico en agua, nutrientes, pH y temperatura dentro de la biopelícula efectuando una distinción con el fenotipo de una célula planctónica.
- Fase de disgregación o dispersión: esta última fase del ciclo permite a la bacteria proliferar y colonizar otras zonas. Etapa necesaria para distintas especies de bacterias por favorecer la transmisión del medio ambiente al hospedero, entre hospederos e incluso dentro del mismo.

La matriz formada tiene función de estabilizar la arquitectura formada y ayudar a la multiplicación de bacterias que se encuentran dentro de ella con canales de agua, iones y comunicación bacteriana mediante el *quorum sensing* (proceso de señal que usan las bacterias para coordinar su comportamiento dentro de la biopelícula, así como su densidad poblacional y paso de nutrientes para el proceso de infección) (Eraso y Ríos, 2016).

2.3.3 Factores de resistencia antibiótica en biopelículas

La importancia que radica por parte de las infecciones originadas por microorganismos formadores de biopelículas es que presentan una alta resistencia hacia los antimicrobianos. Este problema, ha sido demostrado por modelos *in vitro* después del tratamiento con antibióticos (Caldas-Arias et al., 2015).

Según Ortega-Peña y Hernández-Zamora (2018) las bacterias que crecen en estado de biopelícula son mil veces más tolerantes a los microbianos que las de forma libre.

Esta resistencia se debe a la aparición de nuevas mutaciones que son aumentadas cuando los tratamientos se generan de manera intermitente, retardada o cuando las bacterias van creciendo en un matriz de exopolisacaridos común. Cada bacteria en el interior de la colonia estaría realizando transmisión horizontal de genes considerándola como un factor de virulencia (Carballo, 2018).

Estudios realizados, han determinado que este problema constituye una situación adaptativa y reversible debido a la recuperación de la susceptibilidad original de cuando las bacterias regresan al estado planctónico (Stewart, 2015).

Aunque los antimicrobianos eliminen las células normales que se encuentran en la superficie de la biopelícula, sobrevivirían las células persistentes que están protegidas por la matriz de la biopelícula reanudando el crecimiento y repoblación de la comunidad aun después de ser inhibido el antibiótico, manteniendo la infección a pesar de la terapia prolongada (Suclupe-Campos y Aguilar-Gamboa, 2020).

De acuerdo con Eraso y Ríos (2016), uno de los factores que ayudan a la resistencia antibiótica es la propiedad hidrofóbica de superficies, importante para la adhesión de bacterias con

biopelículas en zonas inertes y vivas; factores de creación como la composición química, la estructura de superficie y rugosidad; factores que rodean la masa como el caso de un medio con altas concentraciones de glucosa, la captación de bacterias y expresión de genes para la adherencia así como la biosíntesis de aminoácidos que va de la mano con el mantenimiento de la biopelícula a través del tiempo.

Sin embargo, uno de los factores más importantes son los del desarrollo de la biopelícula ya que las bacterias embebidas por ellas son menos susceptibles a los antimicrobianos y la matriz ofrece esa protección contra la opsonización y fagocitosis provocando la virulencia. Siendo un grave problema clínico, debido a que los antibióticos solo actúan en bacterias planctónicas y no sobre las que están asociadas con la masa de biopelícula (Eraso y Ríos, 2016).

Otro factor, es la alteración del microambiente. Aquí mencionan que la parte más interna de la biopelícula posee baja cantidad de oxígeno por lo que se crea una zona anaeróbica y de bajo pH ocasionando que algunas clases de antibióticos como los aminoglucósidos, disminuyan su efectividad (Ortega-Peña y Hernández-Zamora, 2018).

También la formación de células microbianas persistentes ayuda a la resistencia ya que dentro de la masa de biopelícula se alojan subgrupos o colonias de microorganismos con células persistentes siendo un fenómeno bastante perjudicial en el ámbito clínico (Caldas-Arias et al., 2015).

Finalmente, la adaptación genética es necesaria dentro de la biopelícula para disminuir la susceptibilidad y obtener un fenotipo diferente y protegido. En este factor se ubican los operones de resistencia múltiple a antibióticos (*mar*) que son reguladores que controlan la expresión de varios genes en el fenotipo de *E. coli* ayudando a la resistencia antibiótica (Singh et al., 2017).

2.3.4 *Detección de biopelículas*

Para detectar la maduración y dispersión de los microorganismos formadores de biopelículas se necesita realizar ensayos que faciliten su evaluación, así como la determinación de la actividad antibacteriana sobre el patógeno a estudiar (Kırmusaoğlu, 2019.).

Una característica común de los ensayos para el cultivo de biopelículas es la posible separación de bacterias adherentes de las bacterias que crecen de manera planctónica. En ocasiones, estos métodos ayudan a imitar ciertos aspectos del sistema en estudio (Kırmusaoğlu, 2019).

Uno de los modelos estáticos más utilizados e importantes para el estudio de las primeras etapas de formación de biopelículas es el uso de las placas de microtitulación. Este método está diseñado para cuantificar el grado en que un microbio se unirá a una superficie abiótica (Kırmusaoğlu, 2019).

Estas placas son comercializadas en diferentes tamaños siendo las placas de poliestireno de 96 pocillos las más utilizadas para realizar el cultivo de biopelículas (Bahamondez-Canas et al., 2019).

2.4 *Susceptibilidad antibiótica*

La resistencia antibiótica por parte de UPEC es uno de los principales desafíos en el tratamiento contra las ITU. Este proceso adaptativo es una estrategia de defensa natural que poseen las bacterias contra los antibióticos cuyos mecanismos, mencionados anteriormente, pueden coexistir en una misma cepa otorgándole capacidad al microorganismo para multiplicarse sin problema alguno (Durán, 2018).

La eficacia del tratamiento con antimicrobianos depende de la identificación y patrón de resistencia presente en los uropatógenos. Dentro del grupo de antibióticos empleados en bacterias Gram negativas causante de ITU se encuentra la familia de los aminoglucósidos, beta-lactámicos, quinolonas y misceláneos (Bartoletti et al., 2016; González, 2018).

2.4.1 Aminoglucósidos

Familia de antibióticos que se usan para tratar infecciones bacterianas. Son de uso habitual en el ámbito clínico por ser activos a la mayoría de bacilos Gram negativos además de mantener un perfil de susceptibilidad en los casos de ITU. Debe ajustarse a la función renal (Durán, 2018).

El mecanismo de resistencia en los aminoglucósidos es poco común, sin embargo, cuando ocurre se debe a la ausencia de permeabilidad a la molécula del fármaco, poca eficiencia del receptor ribosómico y la destrucción enzimática del fármaco. La resistencia se ve originada por enzimas modificantes de tipo acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas (Apaza, 2016; Merino, 2017).

En el mecanismo de acción primero las moléculas del aminoglucósido se unen a la superficie bacteriana (Lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas de la membrana externa) aumentando la permeabilidad. Esto permite el ingreso de algunas moléculas al periplasma de la bacteria llegando hasta el citoplasma causando una mala traducción de proteínas. Como consecuencia, se genera el daño a la membrana citoplasmática provocando mayor ingreso de moléculas conllevando a la muerte celular (Ramírez y Tolmasky, 2017).

En la farmacocinética, su efectividad es mayor en ambientes alcalinos, muy pocos se unen a proteínas plasmáticas, poseen un tiempo de vida prolongado ya que se encuentran en la orina aun 48 – 200 horas de haberse suspendido el tratamiento por dosis múltiples. La farmacodinamia indica

que son bactericidas muy afines al ARN mensajero, inhiben la síntesis proteica bacteriana del ribosoma 30S y 50S ya que interfieren la unión con el ARN mensajero al iniciar la síntesis proteica causando fallas en el código genético (Rodríguez-Álvarez, 2002).

Dentro de los aminoglucósidos más utilizados para el tratamiento urinario es la amikacina, un antibiótico semisintético derivado de la Kanamicina, resistente a la acción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos e impide la transcripción del ADN bacteriano por su unión a la subunidad 30S del ribosoma (Ramírez y Tolmasky, 2017).

2.4.2 *Betalactámicos*

Familia que posee un grupo amplio de antibióticos bactericidas como penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Posee betalactamasas que son enzimas que inactivan e hidrolizan el anillo betalactámico encargado de la acción antibiótica (Merino, 2017).

El mecanismo de resistencia se puede generar por varios mecanismos: presencia de betalactamasas (frecuente en *Enterobacteriaceae*), baja permeabilidad y bombas de eflujo. También posee poca toxicidad, pero tiene amplio margen terapéutico (González, 2018).

El mecanismo de acción se da a través de 2 eventos: evita la síntesis de la pared bacteriana e induce la autólisis bacteriana. En el primero, el anillo betalactámico se une a las transpeptidasas impidiendo la formación de la pared celular quedando la bacteria expuesta al medio causando su muerte. En el segundo, los betalactámicos también activan una autolisina endógena bacteriana para eliminar el peptidoglicano (Suárez, 2009).

Las propiedades farmacocinéticas indican que la semivida de eliminación de la mayoría de betalactámicos (con normal función del riñón) es poca, por ello deben ser administradas varias veces al día. Su metabolismo es casi nulo debido a que se encuentran activos hasta su eliminación

renal por el filtrado glomerular y la secreción tubular. En la farmacodinámica, su lenta actividad bactericida es independiente de la concentración plasmática, siempre que esta exceda la concentración mínima del antimicrobiano que impide el crecimiento bacteriano (Suárez, 2009).

Dentro de los betalactámicos se encuentra el grupo de las cefalosporinas. Este grupo presenta un mecanismo de acción que se basa en su unión a las proteínas transportadoras de penicilina, inhibe la síntesis de la pared celular y su autólisis (Gruenberg y Guglielmo, 2021).

Las cefalosporinas se dividen en 4 generaciones según su actividad antibacteriana: primera generación (su actividad es contra *Staphylococcus* no productores de betalactamasas), segunda generación (poseen amplio espectro contra bacterias Gram negativas de origen comunitario como cefuroxima y cefamadol), tercera generación (actúan sobre bacterias Gram negativas de origen nosocomial como ceftazidima, cefoxitima y ceftriaxona) y las de cuarta generación (activas sobre bacterias Gram negativas y positivas como cefepime) (Apaza, 2016).

Ceftriaxona tiene actividad antimicrobiana sobre microorganismos Gram negativos y positivos. Tienen actividad alta en las Enterobacterias como *Escherichia coli*. Inhibe de forma selectiva la síntesis de la pared celular, así como las reacciones de las transpeptidasas bloqueando la síntesis de peptidoglicano. Así mismo, evita el crecimiento y división de la bacteria (Rodríguez, 2015).

2.4.3 Quinolonas

Familia de antibacterianos sintéticos que según su estructura química y espectro antimicrobiano se divide en 4 generaciones: primera generación, con actividad presente para los Gram negativos como ácido nalidíxico; segunda generación, actúan sobre Gram negativos, en especial ciprofloxacino para *Pseudomonas aeruginosa*; tercera generación, acción sobre bacterias

Gram negativas, micobacterias y atípicas como levofloxacino y cuarta generación, aptas para Gram positivos y bacterias anaerobias como trovafloxacino (Arés et al., 2017).

Su mecanismo de resistencia cromosómico es debido a las mutaciones de los genes que ayudan a codificar la enzima girasa y topoisomerasa IV. Otro evento cromosómico, cuando las bombas de eflujo se sobreexpresan y aumenta la impermeabilidad bacteriana. Sin embargo, con el tiempo, también se han descubierto mecanismos de resistencia a nivel plasmídico con respecto al gen *qnr* y la inactivación enzimática (González, 2018).

Estos agentes bactericidas presentan un mecanismo de acción basado en la interferencia de síntesis del ADN, causando la muerte bacteriana por fragmentación cromosómica. A través de las porinas se inducen en la pared celular, inhibiendo el ADN girasa (en Gram negativas) y la topoisomerasa IV (en Gram positivas) que son necesarias para el superenrollamiento del material genético (Álvarez et al., 2015).

Según la farmacocinética, las quinolonas son antibióticos de uso oral. Sin embargo, aquellas de 1era generación deben ser suministradas 4 veces al día, aunque hay ciertas quinolonas que solo deben darse uno o dos veces diarias. Casi la mayoría de estos antibióticos son eliminados por vía renal o hepática. En la farmacodinamia, su actividad bactericida es dependiente de la concentración mínima inhibitoria (CIM) como ciprofloxacino cuando se suministra en altas concentraciones, es capaz de actuar sobre la membrana celular de la bacteria desintegrando tanto la capa interna como externa (Obando et al., 2020; Álvarez et al., 2015).

El antibiótico ciprofloxacino es una quinolona de segunda generación cuya actividad es frente a bacterias Gram negativas y algunas bacterias atípicas. Este antimicrobiano se usa para prevenir infecciones bacterianas por su amplio espectro, por ejemplo, en los tratamientos para

infecciones del tracto urinario. En el caso de la resistencia, existe una enzima que puede inactivarlo, una enzima que es modificante de los aminoglucósidos (Carrillo-Alduenda et al., 2018; Maestre, 2016 y Obando et al., 2020).

2.4.4 Fosfomicina

Antibiótico sintético que presenta actividad de amplio espectro sobre Gram negativos incluyendo Enterobacterias BLEE y carbapenemasas, y Gram positivos. Existen reportes que indican que presente actividad inhibitoria sobre las biopelículas. Este antibiótico es hidrosoluble en altas concentraciones por ello es usado en tratamientos para infecciones urinarias no complicadas (Robino et al., 2020; Merino, 2017).

Entre los mecanismos de resistencia se incluye la disminución de transporte del antibiótico mediante la pared celular y cambios en la hidrólisis enzimática de su anillo. También se determina su inactivación directa mediante metaloenzimas (fosA, FosB y fosX) o quinasas (formA y formB) (Merino, 2017; Candel et al., 2019).

Antibiótico bactericida que actúa en la fase de crecimiento de la bacteria. Su mecanismo de acción consiste en bloquear la síntesis del peptidoglicano. Su transporte intercelular se debe a la acción de las permeasas: transportador del glicerol 3-fosfato (G6P) y de la glucosa 6-fosfato (UhpT). Una vez dentro, el antibiótico inhibe la enzima UDP-N-acetilglucosamina-enolpiruvil transferasa (MurA) (catalizador). Su anillo epóxido se une a MurA inhibiéndola, causando lisis celular (Díez-Aguilar y Cantón, 2019).

La farmacocinética de este bactericida depende de la patofisiología de los pacientes críticos ya que interviene en las concentraciones del lugar infectado, pudiendo reducir su acción antibacteriana. En la farmacodinamia, presenta actividad antimicrobiana frente a patógenos

sensibles, interviniendo en el bloqueo de la síntesis de la pared celular. Contiene amplio espectro en bacterias Gram positivas, Enterobacterias y *Pseudomonas auriginosa* además de ser usada en bacterias multirresistentes (MDR) (Rodríguez-Gascón y Canut-Blasco, 2019).

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

Se realizó un estudio experimental.

3.2 Ámbito temporal y espacial

La investigación se realizó durante el período julio 2018 - febrero del año 2020. Desde el mes de julio del 2018 a enero del 2019 se evaluó la cepa control *E. coli* ATCC 25922 empleando dos metodologías: curvas de crecimiento y recuento de colonias. De febrero a junio del 2019 se realizó la estandarización de la metodología de placa de microtitulación de 96 pocillos con tinción Cristal Violeta. Los ensayos de la producción de biopelículas se desarrollaron en el mes de agosto a noviembre del 2019. Finalmente, la evaluación de la acción diferentes antibióticos sobre la biopelícula generada por UPEC fue realizado durante enero y febrero del año 2020.

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Enfermedades Entéricas, Nutrición y Resistencia Antimicrobiana (LEEN-RA) del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.3 Variables

Para evaluar el efecto de los antibióticos sobre la formación de biopelícula, se consideró hallar dos tipos de variables: variable dependiente, absorbancia obtenida de UPEC y las variables independientes donde se consideró el tipo y concentración de antibióticos.

3.4 Población y muestra

En este estudio se utilizaron cepas criopreservadas de UPEC. Estas cepas fueron colectadas en el estudio “Vigilancia sobre la resistencia antimicrobiana en infecciones adquiridas en la comunidad” realizado en 2 centros médicos del MINSA de los distritos de Los Olivos e

Independencia durante octubre 2014 a setiembre 2015, el cual contaba con aprobación del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia previo a su ejecución.

3.4.1 Cepas para la evaluación de formación de biopelículas

En el estudio anterior, “Vigilancia sobre la resistencia antimicrobiana en infecciones adquiridas en la comunidad”, se aislaron 157 cepas de *E. coli* que causaron ITU en la comunidad. De las cuales, se excluyeron 20 cepas contaminadas, o que no crecieron durante el proceso de reactivación, quedándonos para este estudio con un total de 137 cepas. Se analizaron la totalidad de cepas recuperadas, sin embargo, para el análisis de formación de biopelículas solo se incluyeron 124 cepas debido a que en 13 cepas no se pudo determinar con certeza la producción de biopelículas.

3.4.2 Cepas para la evaluación de la acción de los antibióticos sobre la formación de biopelículas

Del total de 61 cepas que fueron clasificadas como formadores “moderado” y “fuerte” en el ensayo de “Evaluación de formación de biopelículas”, se evaluaron las primeras 45 cepas. No se pudo analizar la totalidad de cepas debido a limitaciones de materiales y tiempo.

3.5 Instrumentos

3.5.1 Materiales

100 unidades de microplacas de poliestireno de 96 pocillos transparente de fondo plano (Corning - GenLab), placas de vidrio, tubos centrífuga de polipropileno 15 mL y 50 mL (Corning - GenLab), matraces de vidrio 100 mL, asa en aro 10 μ L, asa en aro 1 μ L, tips azules sin filtro 1000 μ L (Axygen - GenLab), microtubos 1,5 mL (Axygen - GenLab), palitos de madera, crioviales 1,5 mL (Axygen - GenLab), pipetas estériles 25 mL (Corning - GenLab), micropipetas de 200 μ L y 1000 μ L (Eppendorf Research®), micropipeta multicanal (Eppendorf Research®), asas estériles

10 μ L (Copan Diagnostic - GenLab), tips amarillos sin filtro de 1-200 μ L (Axygen – GenLab) y placas Petri de plástico estériles sin división 90 x 15mm (Samplix - Muestreo y Análisis).

3.5.2 Equipos

Espectrofotómetro, cabina de bioseguridad y Lector de ELISA para placa de microtitulación de 96 pocillos.

3.6 Procedimientos

3.6.1 Estandarización de la técnica en placa de microtitulación de 96 pocillos con tinción Cristal Violeta para producción de biopelículas.

3.6.1.1 Selección de la cepa control, reactivación y criopreservación de las cepas en estudio. La cepa control utilizada en este trabajo fue *E. coli* ATCC 25922. Esta cepa fue seleccionada por lo indicado en la metodología propuesta por Naves et al. (2008), donde el autor indica que esta cepa es productora fuerte de biopelícula.

Las cepas de *E. coli* del estudio “Vigilancia sobre la resistencia antimicrobiana en infecciones adquiridas en la comunidad” se reactivaron de la siguiente manera: Se empleó un asa estéril de 10 μ L, se extrajo una alícuota del Skim Milk donde estaba criopreservada la cepa y se inoculó en un tubo que contenía 3 mL de Luria – Bertani (LB). Se incubó por 22 horas a 37 °C.

Luego se extrajo una alícuota y se estrío por técnica de agotamiento en una placa con Agar Mac Conkey. Se incubó por 22 horas a 37 °C. Se verificó la pureza de las colonias, y si se observaba contaminación, se realizó la identificación con pruebas bioquímicas. En caso la cepa fuera pura, se continuaba con el procedimiento. Luego de incubar la placa, se seleccionó una colonia y se diluyó en un tubo con 3 mL de LB. El tubo se incubó durante 22 horas a 37 °C. De este cultivo, se extrajo 500 μ L y se inoculó en 500 μ L de Glicerol 50%.

3.6.1.2 Selección de medio de cultivo. El medio de cultivo elegido fue LB. Esta elección se basó en la literatura de Stepanović et al. (2007) donde indica que la composición del medio es, probablemente, el factor más importante que influye en la capacidad de las bacterias para producir biopelículas en condiciones *in vitro*. También menciona que debe ser un caldo que no soporte la formación de biopelícula durante la pre-inoculación, pero a su vez sea un medio estable para el crecimiento ya que el pre-inoculo debía estar en 10^8 UFC/mL e inoculo final debía comenzar en 10^6 UFC/mL.

Además, LB es un caldo muy utilizado para los cultivos de *E. coli* porque es un medio enriquecido, fácil de elaborar y permitir el crecimiento favorable de diferentes cepas (Garboza et al., 2011).

También optamos por trabajar con este medio porque es bastante utilizado en otros estudios para la detección de biopelículas en UPEC como, por ejemplo, el trabajo realizado por Pratt y Kolter (1998); Faleiro (2009); Tapiainen et al. (2013); González et al. (2017).

3.6.1.3 Determinación del tiempo de incubación y cantidad de inóculo.

3.6.1.3.1 Evaluación con curvas de crecimiento. Para este ensayo se reactivó la cepa control E. coli ATCC 25922 en agar Mac Conkey, la placa fue incubada por 22 horas a 37° C. Pasado el tiempo, se seleccionó 1 a 2 colonias, dependiendo de su tamaño, inoculándolas en un matraz con 50 mL de LB. Este cultivo madre (ON) fue incubado durante 18 horas a 37° C. Una hora antes de sacar el matraz de la incubadora, en la cabina de flujo, se alistó 12 matraces de vidrio estériles donde, a cada uno, se dispensó 25 mL de LB y luego se inoculó 500 µL del cultivo madre; se incubó a 37 °C. Este mismo pasó, se realizó para la cepa DH5alpha.

Para la primera lectura, se midió la absorbancia de 3 tubos: el primero fue con 3 mL de sólo LB (Blanco), el segundo con 3 mL del cultivo madre (ON) y el tercero fue el tubo 0 (matraz 0 que no se incubó y que indica el punto de inicio de la curva de crecimiento a partir de la inoculación del ON). La lectura de los demás cultivos se realizó cada hora, cumpliendo un total de 8 horas. La medida de cada tubo se realizó por triplicado en el espectrofotómetro a 625 nm y luego fueron promediadas.

3.6.1.3.2 Evaluación con recuentos de colonias. En este ensayo se reactivó la cepa control E. coli ATCC 25922 en agar Mac Conkey y se incubó durante 22 horas a 37° C. Se seleccionó de 5 a 7 colonias dependiendo de su tamaño, inoculándolas en un matraz con 50 mL de LB, el cual se incubó por 18 horas a 37° C.

De este cultivo se extrajo 20 mL y se dispensó en un falcon de 50 mL. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos, se decantó el medio de cultivo sin que se pierda el pellet y se agregó 15 mL de PBS para resuspender el pellet, este paso se realizó por duplicado. Después se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 10 minutos, se decantó el medio de cultivo sin que se pierda el pellet y se agregó 5 mL de PBS para resuspender el pellet.

Luego, se extrajo 1000 μL de suspensión bacteriana anterior al eppendorf 0. Se realizó diluciones sucesivas 10^{-1} al 10^{-9} . Finalmente, se sembró 100 μL de las diluciones -4, -5, -6, -7, -8 y -9 en placas con Agar Mac Conkey, se incubó a 37°C durante 24 horas y se realizó el recuento de colonias. Aquí se evaluó el cultivo de 4 horas y 18 horas debido a que necesitábamos alcanzar la concentración de 10^8 UFC/mL.

3.6.1.4 Determinación de la tinción, tiempos de lavados y densidad óptica. El uso de cristal violeta, PBS y etanol fue según las indicaciones que menciona Stephanovic et al. (2007) para poder evaluar la formación de la biopelícula. Esta metodología se encuentra ampliamente descrita y utilizada en otros estudios como el caso del trabajo presentado por González et al. (2017). Stepanović et al. (2007) indica el uso del Cristal Violeta se debe a que es un tinte muy utilizado en la coloración de bacterias Gram negativas, así como que el tiempo de penetración debe ser 15 minutos para que este líquido pueda penetrar adecuadamente la pared celular del microorganismo.

También menciona el uso del PBS antes de teñir los pocillos con el Cristal Violeta. Esto se debe a que este reactivo ayuda a mantener la misma concentración entre el medio y la bacteria. En cuanto a la cantidad de lavados recomiendan que deben ser 3 veces ya que si son 2 puede haber falsos positivos al momento de realizar la lectura de la placa además que debe ser inoculado de manera manual y no automatizada para así evitar la ruptura de la biopelícula que se encuentra dentro del pocillo.

Asimismo, el etanol permite la medición indirecta de las paredes y fondo de los pocillos. En este paso, el autor recomienda no agitar la placa para evitar el retraso del proceso de resolubilización del colorante. Por último, indica que, tanto para la tinción y los lavados se trabaje con 200 μL cada uno, esto apoyaría a que el inóculo no entre en contacto con el medio ambiente

ya que si nos quedábamos con 300 uL como indican los otros autores, se habría contaminado la placa.

Las lecturas de densidad óptica fueron basadas en la literatura de Pratt y Kolter (1998); Faleiro (2009); Villegas et al. (2013); Gómez et al. (2013) y González et al. (2017). Cada autor utilizaba en sus trabajos diferentes medidas: 570, 590 y 600 nm. En nuestro estudio leímos a 590nm por ser la absorbancia recomendada para medir el cristal violeta, que al ser resolubilizado, se encontraba unido a las células bacterianas en la capa de la biopelícula. Por lo que decidimos utilizar esta medida para las siguientes fases del estudio.

Por último, por experiencia directa y de la Dra. Paola (González et al, 2017-Uruguay), se sugiere que, durante el proceso de lavado y extracción de excedentes, se realice con sumo cuidado para evitar retirar y arrastrar la masa de biopelícula generada en cada pocillo.

3.6.2 Determinación del nivel de formación de biopelículas en aislados clínicos

La determinación del nivel de formación de biopelículas para cada cepa se realizó mediante el uso de la técnica de tinción con cristal violeta en placas de microtitulación de 96 pocillos (método referido por Stepanović et al., 2007). Este procedimiento consistió en realizar una dilución 1/100 en un eppendorf (1260 μ L de LB + 140 μ L del cultivo de 24 horas). En la placa se inocularon 6 pocillos con 200 μ L de LB que era el Blanco (solo LB) y 3 pocillos con 200 μ L de la cepa a evaluar (dilución 1/100 de un cultivo de 24 horas). El ensayo se realizó por triplicado además de evaluar el coeficiente de variabilidad (CV) entre las absorbancias para una muestra considerando que si el CV era mayor a 20 se repetía el ensayo. Este análisis nos permite evaluar la calidad estadística de las estimaciones, cuyas consideraciones son: si el CV es > 20 indica que la estimación es menos precisa, siendo solo útil para un fin descriptivo a diferencia del CV < 20 , que indica una estimación regular, aceptable y precisa (DANE, 2008).

Durante 48 horas a 37 °C, la placa fue incubada y después leída en el Lector de ELISA para microplaca, a 625 nm. Luego se procedió a eliminar las células plantónicas, se lavó con 200 µL de PBS por 3 veces y se inoculó 200 µL de Cristal Violeta al 1%, cada 6 pocillos, con el uso de una micropipeta multicanal. Al culminar, se dejó tapada la placa e incubando a temperatura ambiente por 15 minutos.

Con ayuda de la micropipeta multicanal, por cada 6 pocillos, se extraía el Cristal Violeta realizando lavados con 200 µL de agua destilada estéril por 3 veces. Finalmente, se inoculó 200 µL de etanol al 95% por 30 minutos. La lectura de biopelículas se trabajó en el Lector de ELISA para microplacas, con una medida de la densidad óptica a 590 nm, lo que permitió obtener una mejor lectura de la cantidad de producción de biopelículas.

Según Stepanović et al. (2007) la cuantificación de biopelículas de los aislados clínicos de *Escherichia coli* uropatógena se puede determinar según su ODc utilizando la siguiente formula:

$$\text{ODf} = (\text{promedio de una cepa} - \text{ODc})$$

$$\text{ODc} = (\text{promedio OD del control negativo}) + (3 \times \text{SD del control negativo})$$

Siendo el ODf es la densidad óptica final y la ODc, densidad óptica del valor de corte, es el promedio de los 6 pocillos blancos, es decir, pocillos que solo contenían LB.

La clasificación del nivel de producción de biopelícula se puede hallar en base a las siguientes formulas:

$$\text{OD} \leq \text{ODc} = \text{sin productor de biopelícula}$$

$$\text{ODc} < \text{OD} \leq (2 \times \text{ODc}) = \text{productor débil de biopelícula}$$

$$(2 \times \text{ODc}) < \text{OD} \leq (4 \times \text{ODc}) = \text{productor de biopelícula moderado}$$

$$(4 \times \text{ODc}) < \text{OD} = \text{fuerte productor de biopelículas}$$

En ambas fórmulas el OD es la densidad óptica, el ODc es el valor de corte y el SD es la desviación estándar.

3.6.3 Evaluación de la asociación entre los factores demográficos y microbiológicos con la producción de biopelículas

En esta sección se consideraron los factores microbiológicos como el fenotipo BLEE, el cual se determinó por el método de Jalier, los genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM}, que fueron determinados por PCR convencional y la susceptibilidad a Amikacina, Ceftriaxona y Ciprofloxacino, en base a antibiogramas que se desarrollaron con el método de disco difusión.

Todos los datos, se obtuvieron de la base de datos del estudio previo “Vigilancia sobre la resistencia antimicrobiana en infecciones adquiridas en la comunidad”.

3.6.4 Evaluación del efecto de la concentración de los antibióticos sobre las bacterias UPEC formadoras de biopelículas

3.6.4.1 Selección de antibióticos y sus concentraciones. La selección de antibióticos fue considerada en base a la literatura de Lorian et al. (2005); Blango y Mulvey (2010) y González et al. (2017). Según, este último autor, Amikacina, Ceftriaxona y Ciprofloxacino son antibióticos comúnmente usados en los tratamientos para infecciones urinarias, además de pertenecer a diferentes familias y presentar distintos mecanismos de acción. Para el uso de Fosfomicina, nos guiamos en lo descrito por Blango y Mulvey (2010) quienes indican que este antibiótico es

considerado para casos de infecciones del tracto urinario causados por microorganismos resistentes.

Para determinar las cantidades de concentración, nos basamos en la literatura de González et al. (2017) y Lorian (2005). Ambos autores, explican que el uso de estos antimicrobianos va de acuerdo con su bioviabilidad en la orina humana secretada de un riñón sano. Se consideró los rangos establecidos que presentan dichas literaturas: amikacina (AK: 150, 1000 y 2000 $\mu\text{g/mL}$), ceftriaxona (CTX: 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/mL}$), ciprofloxacino (CRO: 1, 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$) y fosfomicina (FOS: 400, 700 y 1000 $\mu\text{g/mL}$).

3.6.4.2 Preparación de stock de antibióticos. De acuerdo con las concentraciones mencionadas anteriormente, preparamos la solución stock para cada antibiótico: amikacina (200 mg/mL en H_2O), ceftriaxona (200 mg/mL en H_2O), ciprofloxacino (1 mg/mL en H_2O) y fosfomicina (100 mg/mL en H_2O). En el caso de Amikacina, ceftriaxona y ciprofloxacina, el volumen final fue 100 μL mientras que, para fosfomicina suplementado con glucosa, fue 200 μL .

Debido a que ciprofloxacino no es soluble en H_2O , se utilizó HCL para poder disolverlo (certificado de análisis de Sigma-Aldrich), teniendo en cuenta el cambio de color del polvo que viraba de blanco a amarillo. Es así como se dispensó 0.83 μL de HCl (0.1N) para disolver del todo el antibiótico. Para el caso de fosfomicina, se añadió glucosa-6-phosphato (25 $\mu\text{g/mL}$) según como indica el CLSI 2019.

Una vez obtenidos los stocks, se dispensaron de manera equitativa en varios eppendorf y se homogenizaron utilizando un Vórtex, para después ser rotulados y guardados a -4°C . De esta manera se evitaba alterar la estructura y acción del antibiótico cuando era utilizado en cada ensayo. Cabe resaltar que todo este procedimiento se realizó dentro de la cabina de bioseguridad.

3.6.4.3 Determinación del efecto de la concentración de los antibióticos sobre las cepas formadoras de biopelículas.

El procedimiento de esta sección se basa en la consecución de la técnica descrita anteriormente en el punto 3.6.2 con algunas modificaciones. Cabe mencionar que el diseño de placa establecido fue el siguiente: en la misma placa se analizó los 4 antibióticos y se usó los mismos blancos para cálculos posteriores. Se trabajó 3 pocillos para la muestra control sin antibióticos, 6 pocillos control blanco donde sólo se inoculó 200 μ L de LB y 3 pocillos para cada concentración de amikacina, seguido por ceftriaxona, ciprofloxacina y fosfomicina, respetivamente.

Del stock de antibióticos se realizó la preparación para un volumen final de 1.5 mL en LB: amikacina (CC1: 1.13 μ L en 1498.88 μ L LB; CC2: 7.5 μ L en 1492.5 μ L LB y CC3: 15 μ L en 1485 μ L LB), ceftriaxona (CC1: 3.75 μ L en 1496.25 μ L LB; CC2: 7.5 μ L en 1492.5 μ L LB y CC3: 15 μ L en 1485 μ L LB), ciprofloxacino (CC1: 1.5 μ L en 1498.5 μ L LB; CC2: 3 μ L en 1497 LB y CC3: 6 μ L en 1494 μ L LB) y fosfomicina (CC1: 6 μ L en 1494 μ L LB; CC2: 10.5 μ L en 1489.5 LB y CC3: 15 μ L en 1485 μ L LB) más glucosa-6-phosphato (5 μ L para cada concentración de fosfomicina). Además de dispensar 1.5 μ L de LB en 2 eppendorf.

La placa fue leída en el espectrofotómetro a 625 nm, se eliminaron las células plantónicas usando una micropipeta multicanal y se llevó a incubar por 24 horas a 37°C en condiciones estáticas. Los pocillos fueron lavados cuidadosamente con 200 μ L de PBS por 3 veces, después se inoculó 200 μ L de Cristal Violeta al 1% y se dejó la placa tapada incubando a temperatura ambiente por 15 minutos.

Al extraer el excedente se realizaron lavados con 200 μL de agua destilada estéril por 3 veces, se inoculó 200 μL de etanol 95% por 30 minutos y la lectura de la placa fue a 590 nm en el Lector de ELISA, método anteriormente mencionado por Stepanović et al. (2007).

3.7 *Análisis estadístico*

En el análisis descriptivo de las variables demográficas y microbiológicas, se reportó la frecuencia y porcentaje de las variables categóricas; mientras que para la variable numérica “edad de los participantes” se reportó la mediana y el rango intercuartílico (RIC) debido a que los datos de esta variable no presentaron distribución normal. Se evaluó la asociación entre dos variables categóricas con la prueba exacta de Fisher de dos colas, y la asociación entre una variable numérica y otra categórica mediante la prueba U de Mann Whitney. Se consideró un nivel de significancia de 0.05.

La dispersión de las absorbancias y las medianas para los diferentes tratamientos (concentraciones de los antibióticos) se muestran a través de diagramas de cajas y bigote. Para evaluar si existía diferencia significativa entre las absorbancias obtenidas para cada tratamiento de un antibiótico, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas. Para esta prueba, se consideró un nivel de significancia de 0.05. Asimismo, se realizó 6 comparaciones múltiples de dos medias de los tratamientos por antibiótico mediante la prueba T de Student para muestras pareadas. En este caso, se consideró la significancia estadística de 0.0008, el cual se obtuvo de dividir el p-valor global entre el número de comparaciones múltiples.

A pesar de la distribución no normal de las absorbancias entre los diferentes tratamientos, se usaron las pruebas paramétricas debido a que estas tienen mayor poder estadístico que sus equivalentes en pruebas no paramétricas, además, a través de la comparación de las medias se

comprende mejor los efectos que tuvieron los tratamientos sobre la biopelícula. El análisis estadístico se realizó con el programa Stata SE 16.

IV. RESULTADOS

4.1 Estandarización de la técnica en placa de microtitulación de 96 pocillos con tinción de cristal violeta para producción de biopelículas.

4.1.1 Determinación del tiempo de incubación y cantidad de inóculo

Según la literatura descrita por Stepanović et al. (2007) se debía partir de un inóculo inicial de 10^8 UFC/mL para que, posterior a la dilución 1/100 de esta suspensión, se obtenga un inóculo de 10^6 UFC/mL para realizar el ensayo de biopelícula en placas de microtitulación. Se midió la absorbancia ($\lambda=625$ nm) de cultivos con 18 horas de crecimiento de 5 cepas referentes de *E. coli*, hallando que cada una de estas presentaba diferentes densidades (Tabla 1).

Tabla 1

Determinación de las densidades de 5 cepas referentes de E. coli para un cultivo de 18 horas

Cepa de <i>E. coli</i> referencia	O.D ($\lambda=625$)
O157:H7	0.555
DH5alpha	0.375
EPEC	0.313
25922	1.143
042	0.560

Adicionalmente, se realizó por triplicado y en días diferentes las curvas de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (mayor absorbancia) y la cepa DH5alpha (menor absorbancia) con la finalidad de verificar que la variación en las densidades ópticas fue producida por diferencias en su cinética de crecimiento. Observamos que desde la fase logarítmica la curva para *E. coli* ATCC

25922 mostró un crecimiento rápido a diferencia de la cepa DH5alpha, que debido a su lento crecimiento no se pudo observar la fase estacionaria (Anexo1).

Finalmente, se determinó las unidades formadoras de colonias (UFC) en dos momentos: 1. El cultivo de 18 horas de crecimiento usado como inóculo para realizar la curva de crecimiento y 2. A las 4 horas de iniciada la curva de crecimiento (tiempo 4). En la Tabla 2 se puede observar que los cultivos de 18 horas se diferencian por un factor de 10^2 . Es importante mencionar que todos los ensayos realizados en las cepas de *E. coli* de referencia fueron hechos en similares condiciones.

Tabla 2

Determinación de la cantidad de UFC/mL de la cepa E. coli ATCC 25922 y DH5alpha para cultivos de 4h y 18 h

Cepa	Tiempo de cultivo (horas)	UFC/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4*	$2,85 \times 10^7$
	18	$3,35 \times 10^9$
<i>E. coli</i> ATCC DH5alpha	4**	$1,82 \times 10^8$
	18	$2,7 \times 10^7$

Nota. *No se hizo el recuento en la mitad de la fase logarítmica (aprox. 2.5 a 3 horas).

**Mitad de la fase logarítmica: 4 horas

El propósito de realizar las curvas de crecimiento y el recuento de colonias fue determinar el tiempo de cultivo que necesitaban las cepas de *E. coli* para iniciar el ensayo de biopelícula, sin embargo, debido a la variación en crecimiento de las diferentes variedades de *E. coli* evaluadas (Tabla 1, Tabla 2 y Anexo 1), finalmente se optó por iniciar el ensayo a partir de una suspensión bacteriana (OD=1) en caldo LB cuyo inóculo procedía de un cultivo en agar McConkey. Después

de determinar la forma de obtener el inóculo, se evaluó la producción de biopelícula en la cepa *E. coli* ATCC 25922 logrando como resultado valores reproducibles ya que en todos los ensayos realizados se mantuvo con la clasificación de formador de biopelícula de nivel fuerte, como lo indica Naves et al. (2008) (Tabla 3).

Tabla 3

Determinación del nivel de producción de biopelícula para la cepa control E. coli ATCC 25922

Cepa	Prom. BL*	SD BL*	ODc*	ODf*	ODc*	2ODc*	4ODc*	Producción de biopelículas
<i>E. coli</i>	0.075	0.003	0.084	0.602	0.084	0.168	0.336	fuerte
ATCC	0.077	0.007	0.098	0.637	0.098	0.196	0.392	fuerte
25922	0.067	0.003	0.076	0.450	0.076	0.152	0.304	fuerte
	0.095	0.009	0.095	0.461	0.095	0.190	0.380	fuerte

Nota. *Prom. BL.: Promedio del blanco; SD BL: desviación estándar del blanco; ODc: densidad óptica del punto de corte; OD f control: densidad óptica final del control; 2ODc: 2 veces la densidad óptica del punto de corte y 4ODc: 4 veces la densidad óptica del punto de corte.

4.2 Determinación del nivel de formación de biopelículas en aislados clínicos

La determinación del nivel formador de biopelícula se realizó de manera *in vitro* en 124 cepas de UPEC. De ellas, 56 (45.2 %) fueron no formadoras de biopelículas mientras que 68 (54.8 %) cepas, sí fueron formadoras, las cuales se distribuyeron de la siguiente manera: 7 (5.7 %) cepas fueron nivel débil, 13 (10.4 %) cepas nivel moderado y 48 (38.7 %) cepas nivel fuerte (ver Tabla 4).

Tabla 4

Clasificación de la formación de biopelículas en cepas causantes de ITU comunitaria.

NIVEL	n	(%)
No formador	56	(45.2)
Débil	7	(5.7)
Moderado	13	(10.4)
Fuerte	48	(38.7)
Total	124	100

4.3 Evaluar la asociación entre los factores demográficos y microbiológicos con la producción de biopelículas

De las 124 cepas evaluadas, 118 cepas fueron aisladas de pacientes femeninos y 6 cepas, de pacientes masculinos. La distribución del nivel de formación de biopelículas fue más diversa entre las cepas provenientes del género femenino. Sin embargo, se observó que, en las cepas provenientes del género masculino, el 100% eran formadoras de biopelícula: 4 (66.7 %) cepas nivel fuerte y 2 (33.3%), nivel moderado. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la producción de biopelículas (clasificada como formadora y no formadora) y el sexo (Tabla 5 y 7).

La mediana de la edad de todos los participantes fue 47 (RIC: 27 -61). Para los pacientes que tenían cepas formadoras de biopelículas, la mediana de edad fue 42.5 (RIC: 22 - 58), mientras que, para los pacientes con cepas no formadoras de biopelículas, la mediana fue 50 (RIC: 32.5 - 64.5). Dentro de las cepas no BLEE obtuvimos que 51 (57.3 %) cepas fueron formadoras de biopelículas: 37 (41.6 %) cepas nivel fuerte; 8 (9%), nivel moderado y 6 (6.7%), nivel débil; a diferencia del grupo BLEE que fueron 17 (48.6%) cepas: 11 (31.4%) de ellas nivel fuerte; 5

(14.3%), moderado y 1 (2.9%) débil. Adicionalmente, se evaluó la distribución de los genes *blactX-M* y *blaTEM*; y los fenotipos no susceptibles para los antibióticos, amikacina, ceftriaxona y ciprofloxacina entre las cepas de *E. coli* causantes de ITUs formadoras y no formadoras de biopelícula. En todos los casos se observó que no fueron estadísticamente significativos (Tabla 6 y 7).

Tabla 5

Clasificación de la formación de biopelículas en cepas causantes de ITU comunitaria.

CLASIFICACIÓN					
Sexo	No formador n (%)	Débil n (%)	Moderado n (%)	Fuerte n (%)	Total n (%)
Femenino	56 (47.4)	7 (5.9)	11 (9.3)	44 (37.3)	118 (95.2)
Masculino	0 (0)	0 (0)	2 (33.3)	4 (66.7)	6 (4.8)
Total	56 (45.2)	7 (5.6)	13 (10.5)	48 (38.7)	124 (100)

Tabla 6

Clasificación de la formación de biopelículas en cepas causantes de ITU comunitaria según el fenotipo BLEE y No - BLEE

Fenotipo	No formador n (%)	Débil n (%)	Moderado n (%)	Fuerte n (%)	Total n (%)
No-BLEE	38 (42.7)	6 (6.7)	8 (9)	37 (41.6)	89 (71.8)
BLEE	18 (51.4)	1 (2.9)	5 (14.3)	11 (31.4)	35 (28.2)
Total	56 (45.2)	7 (5.6)	13 (10.5)	48 (38.7)	124 (100)

Tabla 7

Clasificación de la formación de biopelículas en cepas causantes de ITU comunitaria según factores demográficos y microbiológicos

Características	Total		Formador de	No formador de	p-valor
	N=124		biopelículas*	biopelículas	
	n	(%)	n (%)	n (%)	
Sexo					
Masculino	6	(4.8)	6 (100.0)	0 (0.0)	0.032
Femenino	118	(95.2)	62 (52.5)	56 (47.5)	
Edad**	47	(27-61)	42.5 (22-58)	50 (32.5-64.5)	0.241
BLEE***					
Si	35	(28.2)	17 (48.6)	18 (51.4)	0.426
<i>bla</i> _{CTX-M}	34	(97.1)	17 (50.0)	17 (50.0)	1.000
<i>bla</i> _{TEM}	7	(20.0)	2 (28.6)	5 (71.4)	0.402
Resistencia a Antibióticos****					
Amikacina	11	(8.9)	5 (45.5)	6 (54.5)	0.542
Ceftriaxona	35	(28.2)	19 (54.3)	16 (45.7)	1.000
Ciprofloxacino	69	(55.7)	36 (52.2)	33 (47.8)	0.587

*Incluyen a formadores de biopelículas nivel débil, moderado y fuerte.

**Mediana (RIC)

***Betalactamasa de espectro extendido.

****Frecuencia de aislamientos no susceptibles por disco difusión

4.4 Evaluación del efecto de la concentración de los antibióticos sobre las cepas formadoras de biopelículas

Los efectos de 4 concentraciones para 4 diferentes antibióticos sobre la producción de biopelículas fueron analizados en un total de 45 cepas de UPEC formadoras de biopelícula de nivel fuerte o moderado. En la Tabla 8 se puede observar que, en todos los antibióticos evaluados, al menos un promedio de absorbancias de las concentraciones evaluadas es diferente ($p < 0.001$).

Además, el promedio de la absorbancia entre la “concentración 0” versus cada una de las concentraciones mayores para un determinado antibiótico disminuye drásticamente. Esta disminución varía entre 60-76% dependiendo del tipo de antibiótico y de las concentraciones evaluadas.

En las Figura 1-4, se puede apreciar visualmente los efectos sobre las biopelículas, así como la distribución de las absorbancias en los datos analizados. Además de la diferencia entre la concentración cero y el resto de las concentraciones, mediante comparaciones múltiples se logró encontrar algunas otras diferencias entre distintas concentraciones, excepto para amikacina donde se halló que las 3 concentraciones del antibiótico (150 ug/ml, 1000 ug/ml y 2000 ug/ml) tienen el mismo efecto (Figura 1). En el caso de ceftriaxona, se encontró diferencia significativa entre el promedio de absorbancias para las concentraciones de 500 ug/ml y 2000 ug/ml ($p = 0.006$). Mientras que, para ciprofloxacino, la diferencia de 0.059 que existe entre los promedios de absorbancia para las concentraciones 2 ug/ml y 4 ug/ml es estadísticamente significativa ($p = 0.002$). Finalmente, en fosfomicina, el promedio de absorbancias para la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ es estadísticamente diferente a la de 400 ug/ml ($p = 0.0002$) y 700 ug/ml ($p = 0.002$). A 1000 $\mu\text{g/mL}$ de fosfomicina se puede observar una menor disminución de la absorbancia y por lo tanto una menor reducción de la biopelícula.

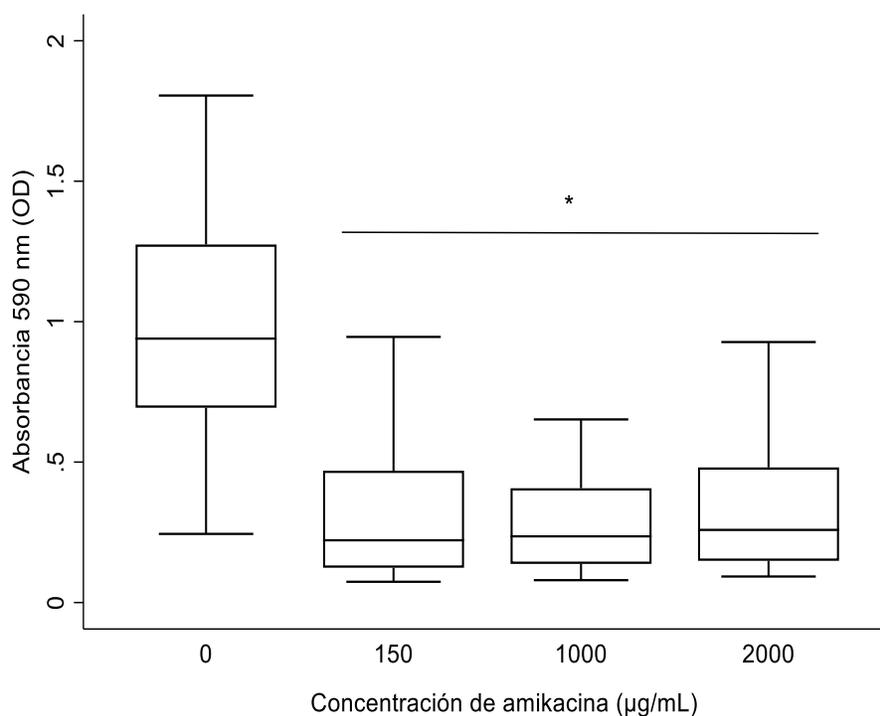
Tabla 8

Efecto de diferentes concentraciones de 4 antibióticos sobre la formación de biopelícula en cepas causantes de ITU comunitaria

Antibiótico	Concentración (µg/mL)	Media (IC 95%)	p-valor
Amikacina	0	0.969 (0.830 - 1.108)	
	150	0.357 (0.262 - 0.452)	< 0.001
	1000	0.342 (0.252 - 0.431)	
	2000	0.351 (0.272 - 0.430)	
Ceftriaxona	0	0.969 (0.830 - 1.108)	
Ceftriaxona	500	0.232 (0.174 - 0.289)	< 0.001
	1000	0.247 (0.184 - 0.311)	
	2000	0.287 (0.224 - 0.351)	
	Ciprofloxacina	0	
Ciprofloxacina	1	0.330 (0.244 - 0.416)	< 0.001
	2	0.326 (0.244 - 0.407)	
	4	0.385 (0.297 - 0.473)	
	Fosfomicina	0	
Fosfomicina	400	0.276 (0.207 - 0.346)	< 0.001
	700	0.279 (0.201 - 0.356)	
	1000	0.342 (0.253 - 0.430)	

Figura 1

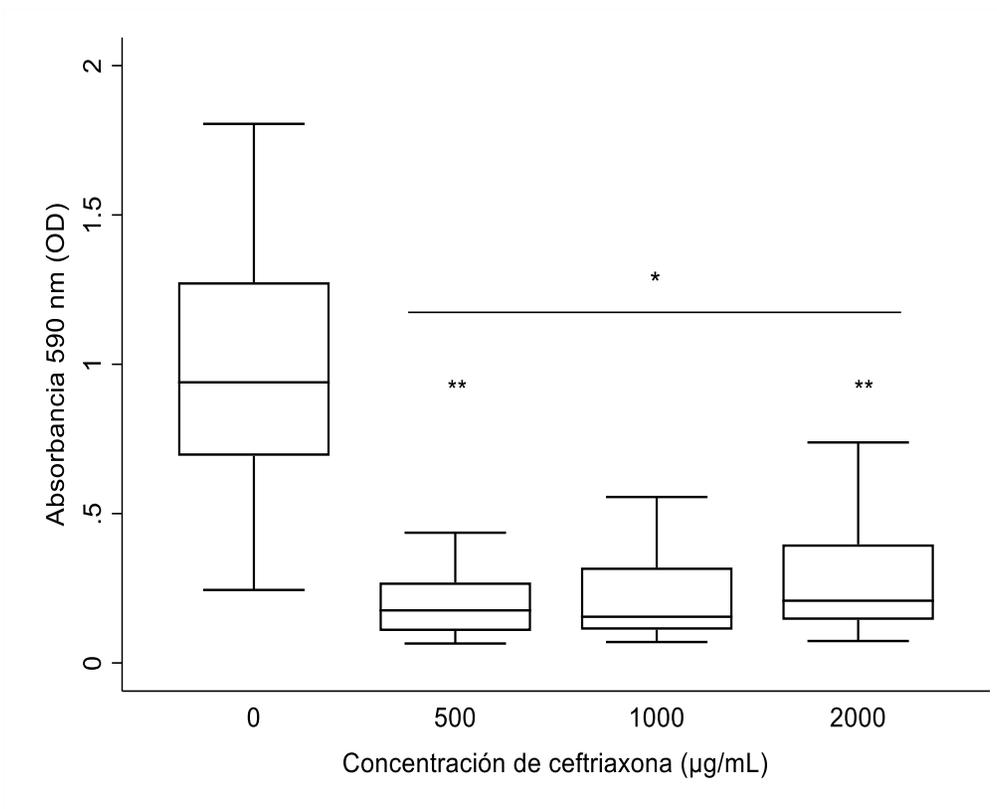
Cuantificación de la biopelícula a diferentes concentraciones del antibiótico Amikacina



Nota. Diagrama de caja que compara el efecto de la Amikacina a concentraciones de 0, 150, 1000 y 2000 µg/mL en las cepas de *E. coli* causantes de ITU a una absorbancia de 590 nm. El asterisco (*) indica la reducción significativa de la biomasa de la biopelícula frente al grupo sin antibióticos o grupo control.

Figura 2

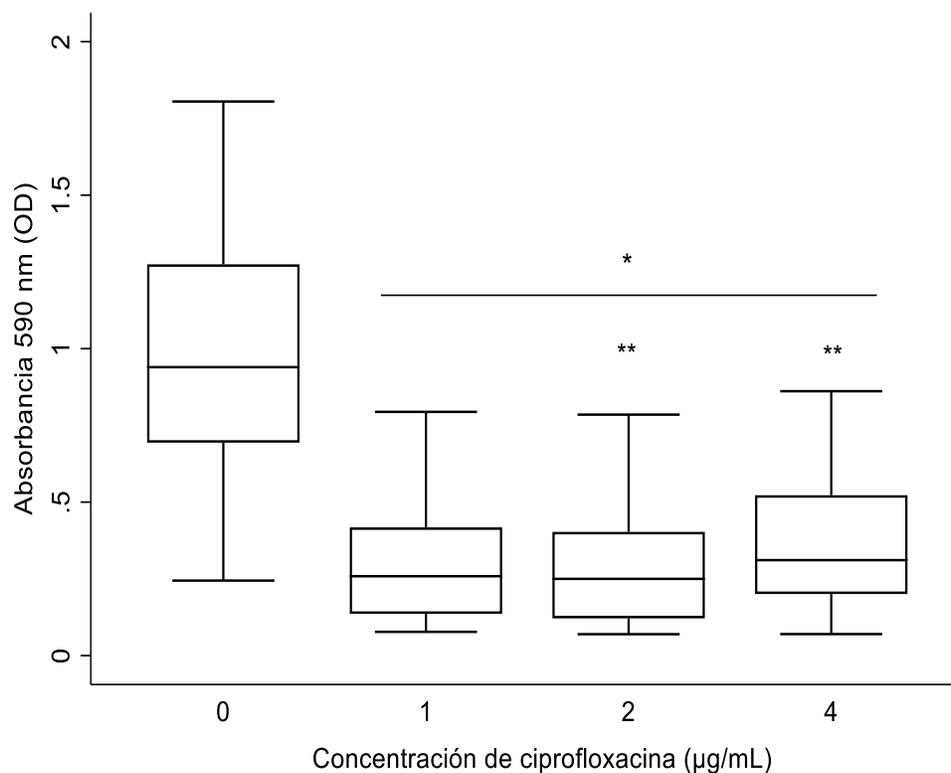
Cuantificación de la biopelícula a diferentes concentraciones del antibiótico Ceftriaxona.



Nota. Diagrama de caja que compara el efecto de la Ceftriaxona a concentraciones de 0, 500, 1000 y 2000 µg/mL en las cepas de *E. coli* causantes de ITU a una absorbancia de 590 nm. El asterisco indica la reducción significativa de la biomasa de la biopelícula: (*) diferencia significativa entre el grupo control y cada una de las concentraciones. (**) Diferencia significativa entre las concentraciones 500 y 2000 µg/mL.

Figura 3

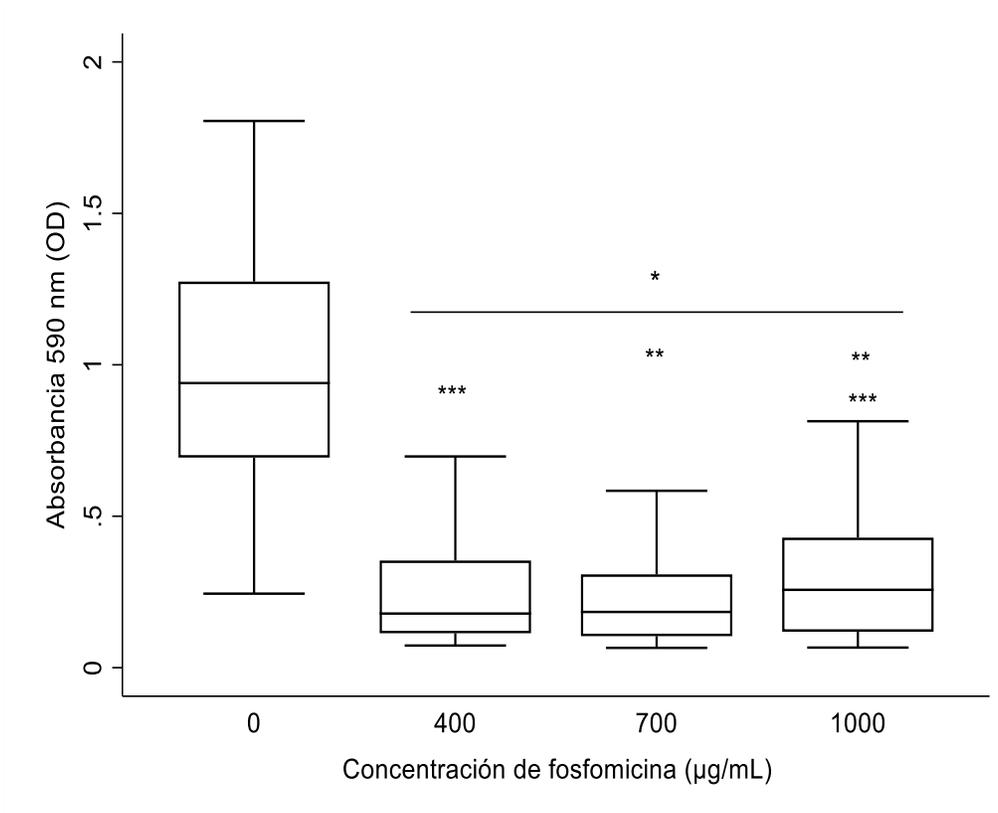
Cuantificación de la biopelícula a diferentes concentraciones del antibiótico Ciprofloxacina



Nota. Diagrama de caja que compara el efecto del ciprofloxacino concentraciones de 0, 1, 2 y 4 µg/mL en las cepas de *E. coli* causantes de ITU a una absorbancia de 590 nm. El asterisco indica la reducción significativa de la biomasa de la biopelícula: (*) diferencia significativa entre el grupo control y cada una de las concentraciones. (**) Diferencia significativa entre las concentraciones 2 y 4 µg/mL.

Figura 4

Cuantificación de la biopelícula a diferentes concentraciones del antibiótico Fosfomicina



Nota. Diagrama de caja que compara el efecto de la fosfomicina a concentraciones de 0, 400, 700 y 1000 µg/mL en las cepas de *E. coli* causantes de ITU a una absorbancia de 590 nm. El asterisco indica la reducción significativa de la biomasa de la biopelícula: (*) diferencia significativa entre el grupo control y cada una de las concentraciones. (**) Diferencia significativa entre el grupo control y las concentraciones 700 y 1000 µg/mL. (***) Diferencia significativa entre las concentraciones 400 y 1000 µg/mL.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En nuestro estudio se logró estandarizar una metodología para la evaluación de biopelículas. Nuestros resultados encontraron que, la cepa *E. coli* ATCC 25922, muestra un nivel fuerte de producción de biopelículas, coincidiendo con la clasificación dada por Naves et al., (2008). Si bien nosotros realizamos varios parámetros para lograr estandarizar la técnica y así determinar el resultado del nivel productor de la cepa control, ellos, indican que la capacidad que tiene esta cepa para formar biopelículas de nivel fuerte, en ensayos *in vitro*, también depende del medio de cultivo utilizado. En sus resultados revelaron que, al colocar esta cepa, en un medio con bajos niveles de nutrientes, se logra la adherencia eficaz de la biomasa de las biopelículas. A diferencia de otros autores, como Pratt y Kolter (1998) que indican que los medios a usar en la evaluación deben estar acompañados de un nutriente más como, por ejemplo, la glucosa. Es así como podemos indicar que *E. coli* ATCC 25922 puede crecer en un medio con bajos nutrientes y desarrollar biomasa de biopelículas sin ningún inconveniente.

De las 124 cepas evaluadas para la formación de biopelículas, 68 (54.8 %) fueron productoras. De estas, 13 (10.4 %) tuvieron producción moderada y 48 (38.7 %) tuvieron producción fuerte. En nuestro trabajo evaluamos una cantidad de población diferente a los demás autores, sin embargo, el tipo de población es similar a la mayoría, en evaluar cepas provenientes de pacientes adultos con excepción de González et al. (2017), quienes trabajaron con cepas de pacientes pediátricos. También, evaluamos cepas de paciente con ITU a diferencia de Ortega y Cerón (2017), y Sudheendra y Basavaraj (2018), quienes incluyeron a pacientes que utilizaban catéter urinario, presentaban síntomas o alguna otra enfermedad. La producción de biopelícula la medimos a una absorbancia de 590 nm similar con el estudio de González (2018). La mayoría de

los estudios mencionados, siguieron la técnica propuesta por Stepanović et al. (2007), por ser considerada una técnica posible de guiarse, manejar y mejorar, a diferencia de Ramesh et al., quienes decidieron basarse en la técnica de Christensen et al. (1982), por ser considerado método gold standard para la detección de biopelículas. Finalmente, en nuestro estudio prevalecieron las cepas productoras de nivel fuerte, así como Sudheendra y Basavaraj (2018) y Zamani y Salehzadeh (2018); en los demás estudios, fue el nivel moderado (ver tabla 9). Con todo ello, cabe indicar que los resultados obtenidos en cada estudio, depende de la cantidad, tipo y caso al que estén relacionadas la población de la cual provienen las cepas a trabajar, así como las fórmulas que se apliquen para clasificar el nivel de formación. Además de que, el proceso para determinar la formación de biopelículas de manera *in vitro* está adherido a las condiciones propuestas en las metodologías de cada investigador.

Tabla 9

Descripción de los estudios que han evaluado la producción de biopelículas.

Características/Autor	González et al., 2017	Ortega y Cerón, 2017	Poursina et al., 2018	Sudheendra y Basavaraj, 2018	Risal et al., 2018	Zamani y Salehzadeh, 2018
Población (n)	116	98	100	1000	50	100
Tipo de población	pediátricos	adultos	Adultos	Adultos	adultos	adultos
Caso relacionado	ITU	ITU con catéter urinario y síntomas	ITU	ITU con otras enfermedades	ITU	ITU
Cepas evaluadas (n)	48	58	80	388	50	94
Nivel de biopelículas						
• Moderada	21 (43.8 %)	-	34 (43 %)	23 (6 %)	29 (58 %)	48 (51.1 %)
• Fuerte	8 (16.7 %)	35 (60 %)	29 (36.3 %)	284 (73.2)	3 (6 %)	36 (38.3 %)
Absorbancia para medir las biopelículas (OD)	590	492	540	570	570	550

La producción de biopelículas con el género femenino se relaciona debido a que las infecciones urinarias predominan más en mujeres que en hombres y las biopelículas hacen que esta enfermedad sea persistente y recurrente debido a que evaden la respuesta del sistema inmune y la acción de los antibióticos (Tadepalli et al., 2016; González, 2018). Interesantemente, en nuestro estudio encontramos que el 100% de las cepas provenientes de varones presentaba producción de biopelículas. Hasta el momento, no hay estudios previos que evalúen el porcentaje de la formación de biopelículas en hombres. Es importante recalcar que solo tuvimos 6 cepas provenientes de hombres, lo cual limita la generalización de este hallazgo. Sin embargo, este hallazgo muestra la necesidad de que se realicen estudios adicionales orientados a evaluar de mejor manera la producción de biopelículas en cepas causantes de ITU en varones.

En nuestra evaluación, hallamos que de las cepas no BLEE formadoras de biopelículas fueron 57.3 % y las cepas BLEE, fueron 48.6 %, a diferencia de Tadepalli et al. (2016) que reporta que el 25% de cepas no BLEE fueron formadoras de biopelículas y 35% cepas BLEE, son productoras de biopelículas. En el estudio de Casablanca y Hurtado, (2018) hallaron que el 95,2% de cepas que presentaron producción de BLEE, eran formadoras de biopelículas y sólo 2 no fueron productoras. Con ello se podría indicar que existe una relación entre la producción de biopelículas y la presencia de genes BLEE, siendo mayor en cepas BLEE positivo (Neupane et al., 2016; González, 2018). Sin embargo, en nuestro estudio, no encontramos ninguna diferencia entre las cepas BLEE y No-BLEE en cuanto a la formación de biopelículas.

Las biopelículas tienen la capacidad de darles, a las cepas de UPEC, la ventaja de adquirir tolerancia a los antibióticos es por ello por lo que disminuir las altas tasas de resistencia y aumentar la mejora en el tratamiento para ITU, sigue siendo un reto en la actualidad (Soto et al., 2007). En nuestro estudio, evaluamos los ensayos de manera *in vitro*, a distintos tipos de antibióticos como

amikacina, ceftriaxona, ciprofloxacino y fosfomicina representando cada uno a un tipo de familia y mecanismo de acción. Los 4 antibióticos trabajados con sus respectivas concentraciones lograron disminuir la biomasa de biopelículas en un 60 – 76% en todas las cepas evaluadas. Es importante recalcar que ninguno de los 4 antibióticos evaluados, incluso en su mayor concentración, pudo inhibir completamente la biomasa de la biopelícula. Esto se podría deber, a lo mencionado según Blango y Mulvey (2010) donde indican que la capacidad de inhibir la biomasa depende del tiempo de incubación que se le da a la biopelícula para formarse. Es decir, que una biopelícula formada en 24 horas es considerada como joven a diferencia, de las biomasas formadas en 48 horas, consideradas como biopelículas maduras debido a la alta producción de exopolisacaridos. Esto podría explicar por qué, en nuestro estudio, no se llegó a observar inhibición total al realizar las lecturas a las 24 horas.

VI. CONCLUSIONES

- 6.1 Una importante proporción de las cepas UPEC recuperadas de pacientes ambulatorios en Lima Norte, son productoras de biopelícula.
- 6.2 De todas las cepas analizadas UPEC, el 55% fueron productoras de biopelículas, y de estas el 39% fueron productoras fuertes.
- 6.3 La acción de los antibióticos redujo la producción de biopelículas hasta un 76%.
- 6.4 La producción de biopelículas se evidencia tanto en cepas provenientes de pacientes del género masculino como en cepas provenientes del género femenino, así como la fuerte producción de biopelículas se presenta tanto en cepas productoras de BLEE como en cepas no productoras de BLEE.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1 Se recomienda evaluar la acción de otros antibióticos que también son comúnmente usados en pacientes en la comunidad con infección al tracto urinario.
- 7.2 Sería importante analizar la producción de biopelícula en cepas de UPEC que generan infecciones urinarias recurrentes.
- 7.3 Se sugiere realizar estudios similares a éste, para evaluar la formación de biopelícula en otros microorganismos aislados de pacientes con ITU, asociándolos con sus patrones de resistencia antibiótica.

VIII. REFERENCIAS

- Aguiniga, L. M., Yaggie, R. E., Schaeffer, A. J., & Klumpp, D. J. (2016). Lipopolysaccharide domains modulate urovirulence. *Infection and Immunity*, 84(11), 3131 – 3140. <https://doi.org/10.1128/IAI.00315-16>
- Alós, J. I. (2005). Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(Supl. 4), 3–8. <https://doi.org/10.1157/13091442>
- Álvarez, A., Garza, S., & Vázquez, R. (2015). Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 32(5), 499–504. <https://www.scielo.cl/pdf/rci/v32n5/art02.pdf>
- Apaza, R. (2016). *Resistencia de uropatógenos gramnegativos y grampositivos a los antimicrobianos que se prescriben en el Hospital Regional Manuel Núñez Butrón 2016* [Tesis de grado, Universidad Nacional del Altiplano]. Repositorio EPG UNAP. <http://revistas.unap.edu.pe/epg/index.php/investigaciones/article/view/39>
- Arés, F., Martínez, R., & Alfayate, S. (2017). Quinolonas en pediatría. *Pediatría Atención Primaria*, 19(74), 83–92. <https://scielo.isciii.es/pdf/pap/v19n74/1139-7632-pap-19-74-00e83.pdf>
- Asmat, P., Peña, H., Ruiz, W. y Lezama, P. (2015). Detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos de tres hospitales de la ciudad de Trujillo-Perú, noviembre 2014. *Pueblo continente*, 26(1), 53-64. <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/287/255>

- Bahamondez-Canas, T., Heersema, L., & Smyth, H. (2019). Current Status of *in vitro* models and assays for susceptibility testing for wound biofilm infections. *Biomedicines*, 7(34). <https://doi.org/10.3390/biomedicines7020034>
- Bakhtiari, N. M., & Javadmakoei, S. (2017). Survey on biofilm production and presence of attachment factors in human uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 10(6). <https://doi.org/10.5812/jjm-13108>
- Baldiris-Avila, R., Montes-Robledo, A., & Buelvas-Montes, Y. (2020). Phylogenetic classification, biofilm-forming capacity, virulence factors, and antimicrobial resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). *Current Microbiology*, 77(10), pp. 3361–3370. DOI: [10.1007/s00284-020-02173-2](https://doi.org/10.1007/s00284-020-02173-2)
- Bartoletti, R., Cai, T., Wagenlehner, F. M. E., Naber, K., & Bjerklund Johansen, T. E. (2016). Treatment of urinary tract infections and antibiotic stewardship. *European Urology Supplements*, 15(9), e709. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2016.04.003>
- Blango, M. G., & Mulvey, M. A. (2010). Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 1855–1863. <https://doi.org/10.1128/AAC.00014-10>
- Caldas-Arias, L. B. (2015). Bacterial biofilms and antibiotic resistance [*Bacterias-Biofilms y resistencia antimicrobiana*]. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca*, 17(1), 20–27. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5816943>
- Candel, F. J., Matesanz-David, M., & Barberán-López, J. (2019). *New perspectives for reassessing fosfomycin: applicability in current clinical practice* [Nuevas perspectivas para la reevaluación de

- la fosfomicina: aplicabilidad en la práctica clínica actual]. *Revista Española de Quimioterapia*, 32(Supl. 1), 1–7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31131586/>
- Carballo Beltrán, D. (2018). *Revisión bibliográfica: Estudio de los mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos* [Trabajo de Fin de Grado, Universidade da Coruña]. Repositorio Institucional da UDC. <http://hdl.handle.net/2183/21257>
- Carrillo-Alduenda, J. L., Flores-Murrieta, F. J., & Rodríguez-Alcocer, A. N. (2018). Actualización en la prescripción de fluoroquinolonas. *Medicina Interna de México*, 34(1), 89–105. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i1.1429>
- Casablanca, J., & Hurtado, L. (2018). *Asociación entre la formación de biopelículas y la producción de betalactamasas de espectro extendido en Escherichia coli aislados de urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue de enero a junio de 2018* [Tesis de licenciatura en Tecnología Médica, Universidad Privada Norbert Wiener]. Repositorio Institucional UWiener. <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/2918>
- Cervantes-Huamán, B. R. H. (2017). *Evaluación de la capacidad de formación de biofilms de diferentes cepas de Listeria monocytogenes sobre acero inoxidable mediante microscopía de epifluorescencia directa* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio Cybertesis UNMSM. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/7220>
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., y Beachey, E. H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 37(1), 318–326. DOI: [10.1128/iai.37.1.318-326.1982](https://doi.org/10.1128/iai.37.1.318-326.1982)

- Davari Abad, E., Khameneh, A., & Vahedi, L. (2019). Identification, phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections and their antibiotic resistance. *BMC Research Notes*, 12(1), 796. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4825-8>
- De la Fuente Salcido, N. M., Villarreal Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., & García Pérez, A. P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(2), 7–16. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57946148002>
- Delcaru, C., Alexandru, I., Podgoreanu, P., Grosu, M., Stavropoulos, E., Chifiriuc, M. C., & Lazar, V. (2016). Microbial biofilms in urinary tract infections and prostatitis: Etiology, pathogenicity, and combating strategies. *Pathogens*, 5(4), 65. <https://doi.org/10.3390/pathogens5040065>
- Delgado, P. (2019). *Infecciones urinarias*. Nefrología al Día. Recuperado de <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-infecciones-urinarias-255>
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2008). *Estimación e interpretación del coeficiente de variación de la encuesta censal: Censo General 2005 – CGRAL*. <https://www.dane.gov.co/files/censos/libroCG2005n26.pdf>
- Díez-Aguilar, M., & Cantón, R. (2019). New microbiological aspects of fosfomycin. *Revista Española de Quimioterapia*, 32(Supl. 1), 8–18. <https://seq.es/wp-content/uploads/2019/05/02cantonesp.pdf>
- Durán, L. (2018). Resistencia antimicrobiana e implicancias para el manejo de infecciones del tracto urinario. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 29(2), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2018.01.002>

Echevarría-Zárate, J., Sarmiento-Aguilar, E., & Osoros-Plenge, F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Médica Peruana*, 23(1), 26–31.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=96623106>

Enríquez Recalde, E. G. (2013). *Genotipificación de factores de virulencia de Escherichia coli uropatógena (UPEC) por medio de la técnica Multiplex PCR, en infecciones de vías urinarias (no complicadas, complicadas y recurrentes) en mujeres mayores de 18 años del Hospital Carlos Andrade Marín durante los años 2010–2011* [Disertación para optar al título de licenciada en Microbiología Clínica y Aplicada, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. Repositorio Institucional PUCE.

<https://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/5682>

Eraso Cadena, M. P., & Ríos Osorio, L. A. (2016). Principales características de las biopelículas relacionadas con procesos patológicos descritos en humanos en los últimos 10 años, revisión sistemática.

Revista Investigaciones Andina, 18(32), 1491–1506.

<https://www.redalyc.org/journal/2390/239047318005/html/>

Faleiro Naves, P. L. (2009). *Formación de biopelículas por Escherichia coli y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. Servicio de

Publicaciones UCM. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/48879>

Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>

Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs.

The American Journal of Medicine, 113(Suppl. 1A), 5S–13S. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01054-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01054-9)

- Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes: Occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics of North America*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>
- Galván, F., Agapito, J., Bravo, N., Lagos, J., & Tamariz, J. (2016). Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 27(1), 22. <https://doi.org/10.20453/rmh.v27i1.2780>
- Garboza, F., Frontado, R., Noguera, N., Ávila, H., Ojeda, L., Ramírez, N., Triana, J., & Triana, F. (2011). Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(2), 138–143. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000200010
- 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? *Revista Española de Quimioterapia*, 26(2), 97–102. Recuperado de <https://seq.es/seq/0214-3429/26/2/gomez.pdf>
- González, M. J. (2018). *Evaluación de la capacidad de Escherichia coli uropatógena de aislamientos clínicos de formar biofilms y comunidades bacterianas intracelulares y la efectividad de diferentes antibióticos* [Tesis de maestría, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias – PEDECIBA]. Repositorio Colibri. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/23243>
- González, M. J., Robino, L., Iribarnegaray, V. J., Zunino, P., & Scavone, P. (2017). Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. *FEMS Microbiology Letters*, 364(5), fnx048. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx048>

- Gruenberg, K., & Guglielmo, B. J. (2021). Otros betalactámicos. En M. A. Papadakis, S. J. McPhee, & M. W. Rabow (Eds.), *Diagnóstico clínico y tratamiento* (e1-03). McGraw Hill. Recuperado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3002§ionid=253509066>
- Guerra, J. A. R., & Aguilar, C. N. (2005). *Patogenia de las infecciones del tracto urinario*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 23(4), 3–8. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(05\)75210-7](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(05)75210-7)
- Guzmán, N., & García-Perdomo, H. A. (2019). Novedades en el diagnóstico y tratamiento de la infección del tracto urinario en adultos. *Revista Mexicana de Urología*, 79(6), 1–14. <https://doi.org/10.48193/rmu.v80i1.546>
- Hinojosa Gutiérrez, E. M. (2018). *Factores de riesgo para infección del tracto urinario recurrente en el servicio de pediatría del Centro Médico Naval entre 2010-2016* [Tesis para optar al título profesional de Médico Cirujano, Universidad Ricardo Palma]. Repositorio digital de la URP. <https://hdl.handle.net/20.500.14138/1161>
- Huillca Miranda, I. A. (2019). *Frecuencia de Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido aislada de pacientes ambulatorios con infección de tracto urinario* [Tesis para optar al título de Licenciado en Tecnología Médica, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <https://hdl.handle.net/20.500.13084/3466>
- Ixtepan Tejero, C. (2018). *Características de virulencia, resistencia y transferencia del material genético en cepas de Escherichia coli uropatógena* [Tesis de licenciatura en Biomedicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio institucional BUAP. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/8138>

- Kirmusaoglu, S. (2019). The methods for detection of biofilms and screening antibiofilm activity of agents. En *Antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84411>
- Lasa, I., del Pozo, J. L., Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). Bacterial biofilms and infection. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163–175. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272005000300002>
- Lifonzo-Mucha, S. J., Tamariz-Zamudio, P. E., & Champi-Merino, R. G. (2018). Sensibilidad a fosfomicina en *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(1), 68–71. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3566>
- Lorian, V. (Ed.). (2005). *Antibiotics in laboratory medicine* (5.ª ed.). Lippincott Williams & Wilkins. https://books.google.com.pe/books/about/Antibiotics_in_Laboratory_Medicine.html?id=HdA4dI8m_T4C&redir_esc=y
- Maestre Verdú, S. (2016). *Resistencia a ciprofloxacino de Escherichia coli aislado en mujeres con pielonefritis aguda que precisan ingreso hospitalario* [Trabajo de fin de máster, Universidad Miguel Hernández]. Repositorio RediUMH. <https://hdl.handle.net/11000/3288>
- Merino Velasco, I. (2017). *Resistencia, virulencia y estructura poblacional de Escherichia coli uropatógena* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. Docta Complutense. <https://eprints.ucm.es/46501/1/T39594.pdf>
- Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(7), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.021>

- Mittal, S., Sharma, M., & Chaudhary, U. (2015). Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens and Global Health*, 109(1), 26–29. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000001>
- Nachammai, S. M., Jayakumar, K., & Aravazhi, A. N. (2016). The effectiveness of antibiotics against a major uropathogen—*Escherichia coli* and its biofilm assay by phenotypic methods. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 4(11), 4820–4828. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20163773>
- Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J. R., Rodríguez-Cerrato, V., Ponte, M. C., & Soriano, F. (2008). Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 585–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x>
- Neupane, S., Pant, N. D., Khatiwada, S., Chaudhary, R., & Banjara, M. R. (2016). Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta-lactamase production in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 5, 5. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0104-9>
- Obando Pacheco, P., Suárez-Arrabal, M. C., & Esparza-Olcina, M. J. (2020). Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos: Antibióticos (v. 3/2020). *Guía ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico* [en línea]. Actualizado el 20 de octubre de 2020. Recuperado el 15 / 03 / 2021, de <https://www.guia-abe.es>
- Orrego-Marín, C. P., Henao-Mejía, C. P., & Cardona-Arias, J. A. (2014). Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Médica Colombiana*, 39(4), 352–

358. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-24482014000400008&script=sci_abstract&tlng=es

Ortega Peña, S., & Cerón González, G. (2017). Producción de biopelículas y resistencia antimicrobiana en uropatógenos aislados de catéteres urinarios en un hospital de rehabilitación física. *Investigación en Discapacidad*, 6(3), 115–121. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2017/ir173c.pdf>

Ortega-Peña, S., & Hernández-Zamora, E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 75(2), 79–88. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000012>

Piera Fernández, M. (2003). Infecciones urinarias: prevención y tratamiento. *Farmacia Profesional*, 17(6), 40–45. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4583723>

Poursina, F., Sepehrpour, S., & Mobasherizadeh, S. (2018). Biofilm formation in nonmultidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan, Iran. *Advanced Biomedical Research*, 7, 40. https://doi.org/10.4103/abr.abr_116_17

Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30(2), 285–293. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x>

Quispe, Z. (2016). Situación epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención en salud e indicadores de referencia, Perú – Boletín Epidemiológico del Perú SE 13-2017, 401–404. *Boletín Epidemiológico del Perú, SE 13-2017* [PDF]. Recuperado el 20/07/2021 de <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2017/13.pdf>

- Ramírez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2017). *Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition*. *Molecules*, 22(12), 2267. <https://doi.org/10.3390/molecules22122267>
- Risal, G., Shrestha, A., Kunwar, S., Paudel, G., Dhital, R., Budha, M. B., & Nepal, R. (2018). Detection of biofilm formation by *Escherichia coli* with its antibiogram profile. *International Journal of Community Medicine and Public Health*, 5(9), 3771–3775. <https://doi.org/10.18203/2394-6040.ijcmph20183562>
- Robino, L., Notejane, M., Casuriaga, A., Galain, B., García, C., Más, M., & Giachetto, G. (2020). Fosfomicina en el tratamiento de la infección urinaria baja en niños mayores de 6 años: evolución clínico-microbiológica. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 91(Supl. 2), s24–s33. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-12492020000800024
- Robledo Martínez, M. G., Avelar-González, F. J., & Guerrero-Barrera, A. L. (2017). *Determinación de los principales factores de virulencia y resistencia de Escherichia coli uropatógena en la población del estado Aguascalientes y su asociación con la contaminación biológica del río San Pedro* [Tesis de maestría en Ciencias (Toxicología), Universidad Autónoma de Aguascalientes]. Repositorio Institucional UAA. <https://hdl.handle.net/11317/1325>
- Rodríguez-Álvarez, M. (2002). Aminoglucósidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 22(1), 20–30. Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2002/ei021d.pdf>
- Rodríguez-Gascón, A., & Canut-Blasco, A. (2019). Descifrando la farmacocinética y farmacodinámica de fosfomicina. *Revista Española de Quimioterapia*, 32(Supl. 1), 19–24. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6555163/>

Rodríguez, R. (2015). Ceftriaxona: antimicrobianos. En *Vademécum Académico de Medicamentos*. McGraw-Hill Education.

<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=90368461>

Shah, C., Baral, R., Bartaula, B., y Shrestha, L. B. (2019). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiology*, 19(1), 204.

<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1587-3>

Shakibaie, M. R. (2018). Bacterial biofilm and its clinical implications. *Annals of Microbiology Research*, 2(1), 45–50. Recuperado de

<https://scholars.direct/Articles/microbiology/amr-2-007.php?jid=microbiology>

Singer, R. S. (2015). Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: Evidence and data gaps. *Frontiers in Microbiology*, 6, 28.

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.00028/full>

Singer, R. S. (2015). Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: Evidence and data gaps. *Frontiers in Microbiology*, 6, 28. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00028>

Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal*, 11, 53–62.

<https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>

Smithson, A. (2008). *Factores dependientes del microorganismo y del huésped en la patogenia de las infecciones urinarias* [Tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, Universidad de Barcelona]. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=81827>

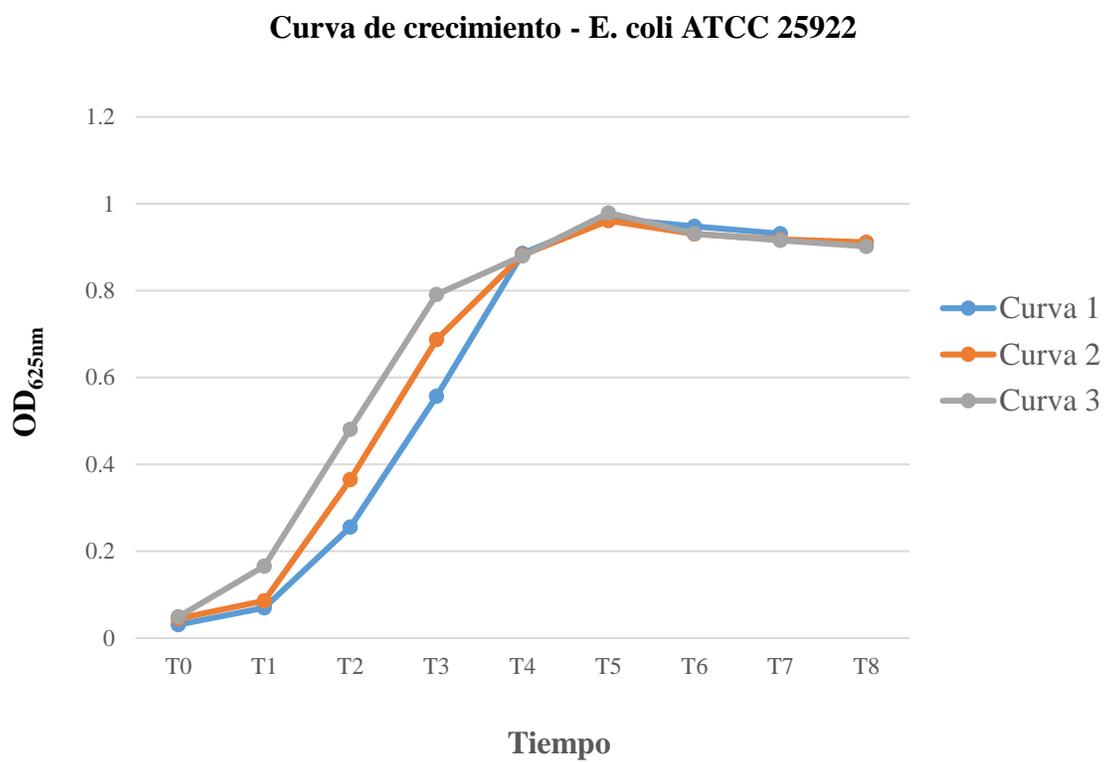
Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000, 28(1), 12–55. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x>

- Soto, S. M., Smithson, A., Martínez, J. A., Horcajada, J. P., Mensa, J., & Vila, J. (2007). Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *The Journal of Urology*, 177(1), 365–368. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.08.081>
- Soto González, S. M. (2014). Importance of biofilms in urinary tract infections: New therapeutic approaches. *Advances in Biology*, 2014, Article ID 543974. <https://doi.org/10.1155/2014/543974>
- Stepanović, S., Vuković, D., Holá, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Čirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica (APMIS)*, 115(8), 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Stewart, P. S. (2015). Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiology Spectrum*, 3(3), MB-0010-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Suclupe-Campos, D.-O., & Aguilar-Gamboa, F.-R. (2020). Persistencia bacteriana: un fenotipo celular de importancia clínica en infecciones crónicas y recurrentes. *Horizonte Médico (Lima)*, 20(1), 77–87. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2020.v20n1.11>
- Sudheendra, K. R., & Basavaraj, P. V. (2018). Analysis of antibiotic sensitivity profile of biofilm-forming uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 9(2), 175–179. DOI: [10.4103/jnsbm.JNSBM_209_17](https://doi.org/10.4103/jnsbm.JNSBM_209_17)

- Tadepalli, S., Prudhivi, S., Myneni, R. B., & Rao, S. (2016). Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* isolates and its association with extended-spectrum β -lactamase production and drug resistance. *Saudi Journal of Pathology and Microbiology*, 1(2), 60–64. DOI: [10.21276/sjpm.2016.1.2.6](https://doi.org/10.21276/sjpm.2016.1.2.6)
- Talavera García, K. G. (2015). *Patógenos causantes de infecciones intrahospitalarias del tracto urinario con alta resistencia a los antibióticos: Hospital Nacional Alberto Sabogal, 2012* [Tesis de segunda especialidad en Patología Clínica, Universidad de San Martín de Porres]. Repositorio Institucional USMP. <https://hdl.handle.net/20.500.12727/1297>
- Tandogdu, Z., & Wagenlehner, F. M. E. (2016). Global epidemiology of urinary tract infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(1), 73–79. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000228>
- Tapiainen, T., Hanni, A. M., Salo, J., Ikäheimo, I., & Uhari, M. (2013). *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(1), 111–115. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1935-4>
- Varela Alonso, C. T. (2008). *Comparación de la resistencia al tratamiento de infecciones urinarias no complicadas a nivel internacional, con historias clínicas del servicio de urgencias del Hospital San Ignacio del año 2007* [Trabajo de grado para optar al título de Bacterióloga, Facultad de Ciencias, Universidad Pontificia Javeriana]. Repositorio Institucional Pontificia Universidad Javeriana. <https://hdl.handle.net/10554/8970>
- Villegas, N. A., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A. E., Etcheverría, A. I., Becerra, M. C., Padola, N. L., & Paraje, M. G. (2013). Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *The Scientific World Journal*, 2013, Article 607258. <https://doi.org/10.1155/2013/607258>

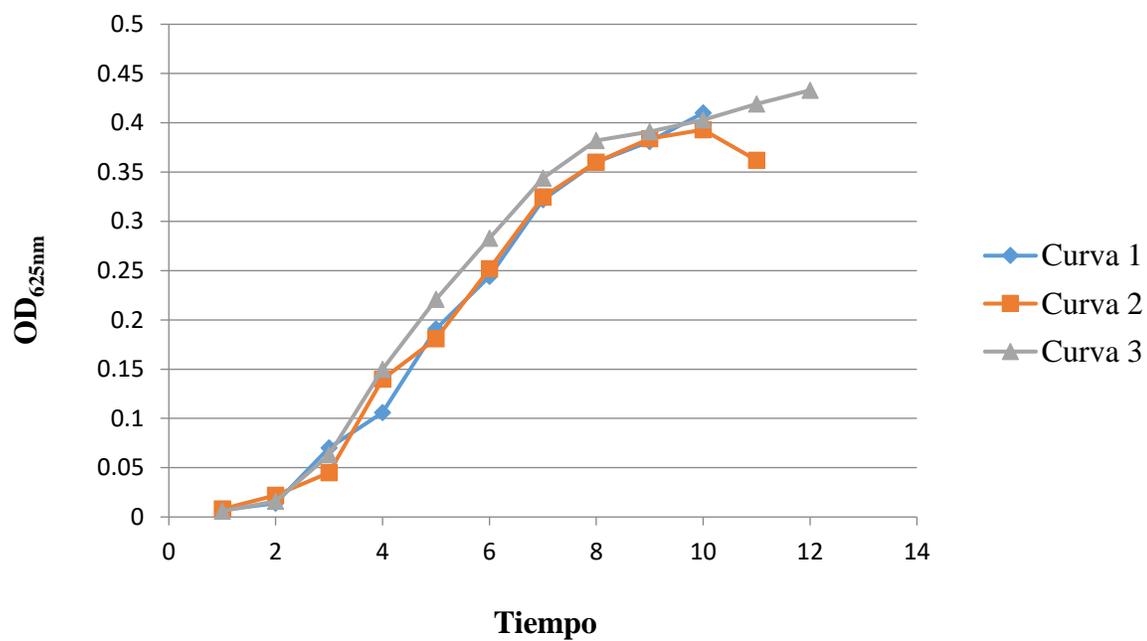
- Vysakh, A., Midhun, S., Jayesh, K., Jyothis, M., & Latha, M. (2018). Studies on biofilm formation and virulence factors associated with uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute pyelonephritis. *Pathophysiology*, 25(3), 123–130. DOI: [10.1016/j.pathophys.2018.07.004](https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2018.07.004)
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.005>
- Yábar, M. N., Curi-Pesantes, B., Torres, C. A., Calderón-Anyosa, R., Riveros, M., & Ochoa, T. J. (2017). Multirresistencia y factores asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos [Original breve]. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), 660–665. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342017000400012
- Zamani, H., & Salehzadeh, A. (2018). Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: Association with adhesion factor genes. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 48(1), 162–167. <https://doi.org/10.3906/sag-1707-3>

IX. ANEXO A



Nota. Curva de crecimiento para *E. coli* ATCC 25922. Evaluación del tiempo desde la T₀ hasta la T₈ a una absorbancia de 625 nm.

Curva de crecimiento - *E. coli* DH5alpha



Nota. Curva de crecimiento para *E. coli* DH5alpha. Evaluación del tiempo desde la T₀ hasta la T₁₂ a una absorbancia de 625 nm.