

**EFFECTO DE IBUPROFENO Y DICLOFENACO SOBRE LA FORMACIÓN
DE BIOPELÍCULAS EN *Escherichia coli* Y *Klebsiella pneumoniae*
CAUSANTES DE INFECCIONES URINARIAS**

**INVESTIGADOR:
VÍCTOR JULIO TEHERÁN VERGARA Q.F.**



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN FARMACOLOGÍA
CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.**

2016

**EFFECTO DE IBUPROFENO Y DICLOFENACO SOBRE LA FORMACION
DE BIOPELICULAS EN *Escherichia coli* Y *Klebsiella pneumoniae*
CAUSANTES DE INFECCIONES URINARIAS**

**INVESTIGADOR:
VÍCTOR JULIO TEHERÁN VERGARA Q.F.**

**DIRECTOR
ROSA BALDIRIS AVILA**

**Trabajo de investigación desarrollado como requisito para optar por el
título de Magister en Farmacología.**

**MAESTRÍA EN FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA**

**GRUPO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y AMBIENTAL.
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.**

2016

NOTA DE APROBACIÓN DEL JURADO

PRESIDENTE DEL JURADO

JURADO

JURADO

JURADO

CARTAGENA DE INDIAS, 2016

La Universidad de Cartagena ni el jurado examinador, se hacen responsables de los conceptos emitidos en el presente trabajo.

CARTAGENA DE INDIAS, 2016

Agradecimientos

Agradezco a Dios por la vida y brindarme la oportunidad de alcanzar esta meta tan importante.

A mis padres Lorenzo y María por su constante apoyo y comprensión en todos los proyectos de mi vida.

A mi hermano Oscar quien siempre confió y creyó en mí para lograr cualquier meta propuesta.

A mi esposa Vanessa por todo el amor que me brinda y el acompañamiento para mi crecimiento como persona y profesional.

A mis amigos Luis Barrios y Julio Acuña quienes han estado presentes en las situaciones buenas y las que no lo son tanto.

A las doctoras Rosa Baldiris y Marlene Durán por sus contribuciones a mi formación profesional, personal y orientación en este trabajo.

Al Grupo de Microbiología Clínica y Ambiental (Facultad de Ciencias Exactas-UdeC) y todos sus integrantes.

Al compañero Alfredo Montes por el apoyo para la realización de este proyecto.

Al comité evaluador por sus comentarios, sugerencias y correcciones en pro del mejoramiento del trabajo.

A la Universidad de Cartagena, Facultad de Medicina y Maestría en Farmacología por contribuir a mi formación personal y profesional.

A todos los que ayudaron hacer posible este proyecto.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado especialmente a mis hijos Thiago Andrés y Marcelo, quienes son la razón fundamental para motivarme a crecer día a día personal y profesionalmente, para brindarles el mejor ejemplo en su formación integral.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	9
INDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN	14
2. GENERALIDADES	18
2.1 Infecciones del tracto urinario.....	18
2.2 Betalactamasas de espectro extendido	20
2.3 Biopelículas	22
2.3.1. Inhibición de formación de biopelículas	25
2.4. Quorum sensing en <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>	26
3. METODOLOGÍA	29
3.1 Aislamiento bacteriano y pruebas de susceptibilidad	29
3.2 Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	30
3.3 Cuantificación de la formación de biopelículas.....	32
3.4 Extracción y cuantificación de N-acil-homoserina lactonas (AHL).....	33
3.5 Identificación de N-acil-homoserina lactonas (AHL)	33
3.6 Inhibición de la formación de biopelículas	34
3.7 Análisis estadístico.....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1 Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas.....	36
4.2 Detección fenotípica de BLEE	44
4.3 Cuantificación de la formación de biopelículas.....	46
4.4 Cuantificación de actividad AHL.....	48
4.5 Identificación de AHL por Espectroscopía infraroja (FT-IR)	51
4.6 Inhibición de la formación de biopelículas.....	53
5. CONCLUSIONES	57
6. RECOMENDACIONES	59
7. BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE TABLAS

DESCRIPCIÓN	PÁGINAS
Tabla 1. Estructura de Ibuprofeno y Diclofenaco	26
Tabla 2. Interpretación de los halos de inhibición de acuerdo a las normas CLSI 2013.....	31
Tabla 3. Criterios para la clasificación de las cepas bacterianas según su capacidad formadora de biopelículas.....	33
Tabla 4. Características de identificación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
Tabla 5. Pruebas bioquímicas usadas para identificación de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>	37

INDICE DE FIGURAS

DESCRIPCIÓN	PÁGINAS
Figura 1. Compuestos señalizadores de los sistemas de Quorum sensing: 1. N- acilhomoserina lactonas (AHL) (R1 corresponde a la cadena alifática y R2 son los grupos sustituyentes que puede tener la cadena tales como: grupos oxo, e hidroxilo), 2. AI-2: furanosil borato diéster.	26
Figura 2. Circuito de quorum sensing, producción de molécula señalizadora y expresión genética.	27
Figura 3. Pruebas de identificación bacteriana. A. Tinción de Gram. B. Prueba de Simmons. C. Pruebas de rojo de metilo. D. Panel de MicroScan.	38
Figura 4. Identificación de las cepas bacterianas aisladas.	39
Figura 5. A. Porcentaje de cepas <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> BLEE. B. Porcentaje de cepas <i>K. pneumoniae</i> y <i>K. pneumoniae</i> BLEE.	40
Figura 6. Prueba de susceptibilidad a antibióticos mediante el método de MicroScan.	42
Figura 7. Concentración mínima inhibitoria mediante sensidiscos.	43
Figura 8. Detección fenotípica de BLEE. A. Efecto balón de futbol americano. B. Efecto de cola de pez y balón de futbol americano. C. Efecto de huevo y balón de futbol americano.	45

DESCRIPCIÓN	PÁGINAS
Figura 9. Formación de biopelículas en microplacas de 96 pozos de las cepas evaluadas.	46
Figura 10. Clasificación de los aislados según su capacidad para formar biopelículas.	47
Figura 11. Extracción de acil homoserina lactonas (AHL) de cada cepa.	49
Figura 12. Actividad acil homoserina lactonas de los aislados clínicos.	50
Figura 13. Espectro FT-IR de los grupos funcionales de AHL producidas por cepas de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> fuertes formadoras de biopelícula.	51 – 53
Figura 14. Efecto del ibuprofeno sobre la formación de biopelículas en cepas de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> .	54
Figura 15. Efecto del diclofenaco sobre la formación de biopelículas en cepas de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> .	55

RESUMEN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son un problema frecuente en adultos, causantes de más o menos un tercio de las visitas en atención primaria. Más del 85% de los casos son provocados por *Escherichia coli*, seguidos de *Klebsiella pneumoniae* y otros gérmenes como *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

Varios estudios reportan que la resistencia bacteriana en cepas uropatógenas está asociada a la producción de biopelículas y a fenotipos multirresistentes relacionados directamente con la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que alertan sobre el peligro de estos patógenos a nivel comunitario y hospitalario, especialmente debido a la codificación genética de estos en plásmidos altamente transmisibles. En particular, teniendo en cuenta que la producción de biopelículas a través del mecanismo del Quorum Sensing (QS) hace a la bacteria 1000 veces más resistente a la terapia antibiótica. En los últimos años, estos resultados han generado la búsqueda de nuevos mecanismos de control en diferentes clases farmacológicas para su posible actividad antimicrobiana.

En la actualidad, fármacos como la prometazina un antihistamínico, promazina A un agente psicotrópico, metildopa un antihipertensivo, la dobutamina un fármaco cardiovascular, diclofenaco, ketofeno e ibuprofeno, antiinflamatorios no esteroideos (AINES), son medicamentos a los cuales se les reporta que poseen potente actividades antimicrobianas.

Esta investigación estuvo enfocada en la evaluación del efecto de dos fármacos tipo AINES tales como el ibuprofeno y el diclofenaco, como inhibidores de la formación de biopelícula en aislados de *E. coli* (83) y *K.*

pneumoniae (17) en pacientes con diagnóstico de infección urinaria atendidos en instituciones prestadoras de servicios de salud en la ciudad de Cartagena de Indias (Colombia). La resistencia bacteriana y los fenotipos según la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) fueron analizadas por el método automatizado de MicroScan y el test de sinergia de doble disco (DDST) respectivamente en 100 aislados clínicos. Además, se realizó la extracción líquido-líquido e identificación por espectroscopia de infrarrojo (FT-IR) de acil homoserina lactonas (AHL) moléculas señalizadoras en el quorum sensing generado por bacterias gramnegativas.

En este estudio, el 12.06% de las cepas de *E. coli* y 11.76% de *K. pneumoniae* se identificaron como productoras de BLEE. Además, la capacidad para formar biopelículas en la mitad de las cepas fue moderada, y el 5% del total resultaron con actividad fuerte. La resistencia múltiple frente a los antibióticos evaluados fue del 65% fue correlacionada con la mayor actividad para formar biopelículas. Adicionalmente se encontró que las cepas fuertes formadoras de biopelículas presentaron una actividad relativamente alta en la producción de acil homoserina lactonas (AHL). Los resultados de este estudio sugieren que ibuprofeno y diclofenaco podrían ser útiles en el manejo de infecciones del tracto urinario al reducir la capacidad de formación de biopelícula de *E. coli* y *K. pneumoniae* donde fueron evaluados a concentraciones sub-CMI.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITU), localizadas en la vejiga (cistitis) o en los riñones (pielonefritis), constituyen el segundo tipo de infección más común en humanos después de las infecciones respiratorias, presentando entre 150-250 millones de casos por año alrededor del planeta [1]. Este tipo de infecciones representan una causa significativa de morbilidad en niños y adultos sin importar sexo ni edad, además, se considera que toda mujer durante su vida sufre al menos un episodio de ITU, el cual aumenta la probabilidad (20-40%) de nuevas infecciones e incluso complicaciones mayores como el cáncer de vejiga [2, 3]. Se estima que el costo anual para las ITU adquiridas en la comunidad supera los US\$6 billones a nivel mundial, cifra que va en aumento junto al número de casos [4, 5]. Dentro de las ITU complicadas, aquellas que ocurren en los hospitales (como infecciones nosocomiales) se hallan principalmente asociadas al uso de catéter urinario y representan el 40% de todas las infecciones adquiridas en instituciones prestadoras de salud por lo que constituyen el tipo más común de infección nosocomial [6]. En Colombia, las ITU son el segundo motivo de consulta más frecuente, después de las infecciones respiratorias [7].

Las ITU son causadas por un variado número de patógenos, destacándose *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus saprophyticus* [8]. *Escherichia coli* es el microorganismo aislado más frecuente de las ITU (alrededor del 80%) y uno de las principales causantes de bacteremias por gram-negativos tanto en pacientes hospitalizados como en la comunidad [9].

En estas cepas uropatógenas se han identificado factores de virulencia estrechamente relacionados a la colonización, persistencia y patogénesis en el tracto urinario, destacándose la formación de biopelícula la cual provee un

microambiente rico en nutrientes que promueve el crecimiento y permanencia microbiano en el sitio infectado, así como su protección de agentes antimicrobianos [10]. De hecho, las bacterias con capacidad formadora de biopelículas pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a la quimioterapia convencional así como a la respuesta inmune del hospedador [11].

Uno de los fenómenos importantes para la formación de biopelículas es el quórum sensing (QS), el cual ejerce una gran influencia en la producción de factores de virulencia a través del control de reguladores transcripcionales por efecto de cambios en la densidad poblacional. Otras características fenotípicas, tales como la bioluminiscencia, unión superficial y la producción de antibióticos se consideran que están reguladas por sistemas QS. La mayoría de los sistemas de QS descritos hasta la fecha en bacterias gramnegativas dependen de N-acil-homoserina-lactonas (AHL) como moléculas señal, y estos sistemas QS se han encontrado en más de 100 especies bacterianas [12].

Las elevadas tasas de frecuencia de ITU sumado a la creciente aparición de multiresistencia farmacológica a los antibióticos betalactámicos mediante la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) constituye una amenaza a todos los sistemas de salud del planeta [1]. En el caso particular de la *Escherichia coli*, se han reportado cepas resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas (incluyendo de tercera y cuarta generación) y al aztreonam, además de presentar resistencia cruzada al trimetropin/sulfametoxazol y las quinolonas [13]. Otros reportes de sensibilidad *in vitro* de *E. coli* causante de ITU no complicada han mostrado una alta tasa de resistencia a amoxicilina, superior al 20% y en muchos casos al 50%, y resistencias variables al cotrimoxazol, en algunas zonas por encima del 20%. En general, las resistencias a fluoroquinolonas, cefalosporinas orales y amoxicilina/clavulánico están por debajo del 10%, aunque en el caso de las fluoroquinolonas, con tendencia a incrementarse

con el paso de los años [14]. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* uropatógena se han evidenciado cepas resistentes a ciprofloxacino, moxifloxacino, ácido nalixílico, gentamicina, ceftazidima y nitrofurantoína asociadas a la producción de BLEE [15], motivo de gran preocupación a la comunidad internacional.

Las BLEE, constituyen un problema terapéutico y epidemiológico de gran magnitud, la presencia de cepas BLEE en las infecciones, conllevan a multiresistencia ya que son portadoras de otros genes que provocan resistencia cruzada a quinolonas, aminoglucósidos e incluso cotrimoxazol; de ahí la gran importancia de una adecuada y oportuna identificación [16]. Es tanta la problemática que la Organización Mundial de Salud (OMS) ya reconoce la importancia de estudiar los agentes etiológicos, su emergencia y los perfiles de la resistencia antimicrobiana adquirida en pacientes con ITU de diferentes regiones geográficas, así como la necesidad de desarrollar y optimizar estrategias apropiadas para su efectivo control [5]. Además, la cantidad de datos generados en países en vía de desarrollo es insuficiente, por lo que no se conoce con veracidad si las ITU son más frecuentes y severas en comparación a regiones desarrolladas [17].

Se han desarrollado varios procedimientos con el objetivo de prevenir la formación de biopelícula o de erradicar biopelículas preformadas. Entre ellos se incluyen la prevención de la adherencia inicial de la bacteria a superficies abióticas, bióticas, o a otras bacterias, interrupción de los mecanismos de quorum sensing que son necesarios para la expresión genética de componentes de la biopelícula, inhibición de la biosíntesis de polisacáridos y proteínas de la matriz de la biopelícula y la búsqueda y perfeccionamiento de enzimas que puedan degradar la matriz y permitir el acceso de los antimicrobianos convencionales y de los mecanismos de defensa del propio hospedador [18].

Forman parte de las estrategias que dificultan la formación de biopelículas, la fabricación de materiales con compuestos incorporados como por ejemplo iones de plata, agentes antimicrobianos clásicos que son liberados de manera prolongada, el desarrollo materiales con superficies alteradas (hidrofobicidad) y también de tratamientos antiadhesivos con el recubrimiento por moléculas como heparina, proteínas o biosurfactantes que perturben las fuerzas físico-químicas necesarias para la adhesión inicial [19, 20].

Por tanto, el presente trabajo está enfocado a la evaluación del efecto de ibuprofeno y diclofenaco como inhibidores de la formación de biopelículas en 100 aislados de pacientes con diagnóstico de infección urinaria en Cartagena de Indias (Colombia), determinando la resistencia bacteriana y los fenotipos según la producción de BLEE, además de la determinación de su capacidad de formación de biopelícula y la detección e identificación de moléculas señalizadoras que participan en el quorum sensing de bacterias gram-negativas, esclareciendo de esa manera el perfil de resistencia de las cepas bacterianas prevalentes en nuestra comunidad.

2. GENERALIDADES

2.1 Infecciones del tracto urinario

Se define como Infección de tracto urinario (ITU) a la presencia de microorganismos capaces de reproducirse en el tracto a través del cual la orina fluye desde los riñones, vías urinarias y vejiga hacia el medio exterior [21]. Las ITU están entre las infecciones más comunes que afectan a la humanidad (más de 20 millones de visitas médicas anuales), en especial las mujeres, constituyendo un enorme costo a los sistemas de salud; calculándose en más de US\$ 6 billones al año [4].

Se puede distinguir entre las ITU complicadas y no complicadas, las cuales a su vez puede clasificarse según marcadores específicos (clínicos o de laboratorio) de cistitis aguda, uretritis, bacteriuria asintomática, cistitis idiopática y crónica, prostatitis y pielonefritis [1]. Las ITU complicadas se asocian a distorsiones físicas o anomalías en el tracto urinario y son causados por un grupo más diverso de organismos comparados con las ITU no complicadas. En ausencia del tratamiento y esquema terapéutico apropiado, las ITU pueden progresar a condiciones más graves como urosepsis y falla renal [22].

Normalmente la orina es estéril pero contiene fluidos, sales y productos de excreción los cuales al entrar en contacto con microorganismos del tracto digestivo colonizadores de la uretra la contaminan; así, *Escherichia coli* es la causa más frecuente de ITU; penetra por la uretra a partir de una contaminación fecal existente en la piel circundante, a veces un traumatismo en la uretra femenina durante un contacto sexual posibilita el que se introduzcan las bacterias en el tracto urinario [23]. Además, cualquier

anormalidad del tracto urinario que impida el flujo (por ejemplo, cálculos renales y engrosamiento de la próstata) aumenta el riesgo de desarrollar una ITU [24]. Más del 50% de todas las mujeres experimentan una ITU al menos una vez en su vida y más del 30% experimenta una infección recurrente que puede progresar a una infección crónica [3].

La mayoría de las ITU son causadas cuando los factores de virulencia provenientes de bacterias entéricas del peritoneo, el área periuretral, la uretra, la vejiga y, ocasionalmente, los riñones, superan las barreras interpuestas por la respuesta inmune del hospedero [21]. La mayoría de estas infecciones son producidas por bacterias gram-negativas siendo *E. coli*, proveniente de la flora intestinal normal, la que representa la más alta incidencia por lo que se considera el predictor más importante de costo-efectividad de los agentes terapéuticos [9]. Otras bacterias gram-negativas asociadas a ITU son *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp. y *Proteus* spp., así como las gram-positivas *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* spp., *Ureoplasma* sp. y *Streptococcus agalactiae* [10].

El tracto urinario no sólo provee un potencial nicho para los patógenos colonizadores de la superficie, sino también orina la cual es utilizada por muchos microorganismos para facilitar su crecimiento. Es por ello que pacientes con defectos en la micción son más susceptibles a desarrollar ITU [3]. Además del flujo de la orina y el epitelio impermeable de la vejiga y los uréteres, el tracto urinario utiliza varios mecanismos de defensa antibacterianos incluyendo péptidos, uromodulina y citoquinas como IL-17a e IL-9 [25]. A nivel celular, las células epiteliales de la vejiga constituyen la primera línea de defensa contra las ITU ya que están involucradas en la impermeabilización hacia la orina y patógenos a través de la secreción y metabolismo de moléculas como mucinas, lípidos, esfingolípidos y colesterol [26]. De igual manera, la respuesta inmune innata del hospedero juega un

papel importante en esta primera línea de defensa entre las que se destacan citoquinas, quemoquinas y factores del complemento tales como CCLs, CXCLs, IL-8, IL-27, IL-1 β , IL-12, TNF- α , C3 y el factor B, los cuales reclutan y activan macrófagos, linfocitos T, células asesinas naturales y neutrófilos en los sitios de infección [27].

2.2 Betalactamasas de espectro extendido

En los patógenos gram-negativos, la producción de betalactamasas representa el más importante factor contribuyente a la resistencia microbiana. Los cuatro principales grupos de antibióticos beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenems) tienen un anillo que puede ser hidrolizado por este tipo de enzimas conllevando una reducción en la efectividad de estos [24]. Típicamente son codificados mediante plásmidos y se derivan de los genes TEM-1, TEM-2 o SHV-1 mediante mutaciones que alteran la estructura primaria del sitio activo de estas proteínas, razón por la que se extiende su actividad a un gran número de antibióticos [28].

Las betalactamasas pueden clasificarse acorde dos esquemas generales: la clasificación molecular de Ambler y al sistema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medieros [29, 30]. El primero de ellos divide a las betalactamasas en 4 clases (A, B, C y D) de acuerdo a su homología estructural (en especial, la similitud de aminoácidos) y no a sus características fenotípicas. Las betalactamasas A, C y D son serina β -lactamasas, mientras que la clase B son metalo β -lactamasas [29]. Por otro lado, el sistema de Bush-Jacoby-Medieros agrupa a las betalactamasas según sus similitudes funcionales (perfiles de los sustratos e inhibidores), destacándose también 4 grupos y múltiples subgrupos [4]. Este último sistema es de mucha más relevancia para el personal médico debido a que considera los antibióticos beta-lactámicos que son clínicamente relevantes [22].

Si bien no existe un consenso en la definición de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se considera que son betalactamasas capaces de conferir resistencia bacteriana a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y aztreonam (pero no cefamicinas o carbapenems) mediante hidrólisis de estos antibióticos, y los cuales son inhibidos por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico [30]. De igual manera, se encuentran casos de co-resistencia a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas [31].

Las BLEE pertenecen a la clase A (según Ambler) y al grupo 2be (según Bush-Jacoby-Medieros) y sus patrones de resistencia varían en función del microorganismo al cual pertenezcan [32]. Las BLEE producidas por *E. coli* y *K. pneumoniae* son de gran interés debido a su participación en las ITU conllevando de esa manera a un aumento en la morbilidad y mortalidad por infecciones bacterianas.

2.3 Biopelículas

Una gran variedad de bacterias son capaces de formar biopelículas, las cuales son definidos como una estructura tridimensional de células agregadas en una matriz de exopolisacáridos producida por ellos mismos, el cual es capaz de adherirse a superficies vivas o inertes [9]. La formación de biopelículas en superficies puede ser considerada como una estrategia universal de supervivencia y óptimo posicionamiento para el consumo de nutrientes, así como forma una barrera que impide el acceso de agentes antibacterianos tales como anticuerpos, células del sistema inmune y antibióticos [17]. Estas pueden variar en espesor de una capa monocelular hasta 6-8 cm pero normalmente presentan en promedio 100 μm y pueden ser observados después de los procesos de multiplicación y diseminación de los microorganismos formadores [33].

Las biopelículas comúnmente están compuestas por 3 capas: una superficial, una basa y la capa de unión o intermedia. La capa base está formada por microorganismos fuertemente unidos y la superficial permite la liberación de microorganismos para la posterior colonización de las áreas adyacentes [24]. Después del anclaje a una superficie las bacterias experimentan una posterior adaptación, una elevación de la síntesis de exopolisacárido y una resistencia antimicrobiana, así como también una resistencia a la radiación ultravioleta (UV) y una elevada producción de metabolitos secundarios [34]. Las células en la capa más interior tienen una actividad metabólica baja así como una tasa de crecimiento inferior a los microorganismos de las capas más externas lo cual las hace menos susceptibles a los antibióticos. Este comportamiento es favorecido también debido a la anaerobiosis relativa que se genera debido al consumo de oxígeno y glucosa en las capas más internas, por medio del cual, para garantizar su supervivencia, los microorganismos enlentecen o paran su crecimiento [24].

Los cambios fenotípicos observados en los microorganismos al adherirse a las superficies son debido a la expresión diferencial de genes dentro de las biopelículas, en ocasiones asociados al proceso de quórum sensing en etapas tempranas de formación [12]. El quorum sensing es un fenómeno de comunicación célula-célula donde las bacterias utilizan el lenguaje químico para la regulación de genes cuando la concentración celular es alta. Este fenómeno les confiere un cambio fisiológico y/o morfológico, permitiéndoles coordinar actividades y actuar de forma grupal. La comunicación intercelular se relaciona con algunos problemas para la salud humana como la expresión de los factores de virulencia de bacterias infecciosas oportunistas en algunas enfermedades crónicas [35, 36].

Las señales químicas, denominadas moléculas autoinductoras o moléculas de señalización, son producidas por la bacteria de manera constante, y son utilizadas en el proceso de comunicación celular, cuando la población celular ha alcanzado un umbral –el quorum-, permitiéndoles a las bacterias no sólo monitorear la densidad poblacional sino también sincronizar su expresión genética [37]. Estas moléculas, en especial, aquellas pertenecientes a la clase de las N-acil homoserina lactonas (AHL), son liberadas en el ambiente local e interaccionan con proteínas de unión al ADN. A medida que la concentración de AHL alcanza un nivel umbral, se induce la transcripción de genes específicos en la población bacteriana. En el caso de *E. coli* se conoce que los mecanismos de formación de biopelículas están mediados por circuitos de QS dirigidos por el autoinductor 2 (AI-2), el cual aumenta hasta 30 veces la capacidad formadora de este mecanismo de resistencia bacteriana así como la masa y el espesor de la misma [38]. Cabe resaltar que a pesar de que se considera que *E. coli* no produce las sintasas de AHLs, se han realizado reportes de su presencia en aislados de cepas uropatógenas [39].

La consolidación de estas biopelículas está en gran medida gobernada por quorum sensing. Las biopelículas en ciertas especies logran un grado de organización estratificado, caracterizado por grupos heterogéneos de organismos individuales, en los cuales es posible encontrar a bacterias de una misma especie en distintas regiones, exhibiendo comportamientos diferentes [35]. Durante la formación de la biopelícula generalmente se consideran dos etapas principales: 1. La deposición de los microorganismos y 2. La fijación mediante adhesión microbiana y su posterior anclaje a su superficie. El evento inicial consiste en la adhesión bacteriana y la deposición de los componentes como proteínas, electrolitos y algunos componentes no elucidados en la superficie del área del tracto urinario, los cuales dependen de características como la hidrofobicidad y permiten la formación de estructuras similares a mallas dentro de los agregados celulares [24]. Este proceso es regulado por el polisacárido llamado PIA (adhesina intracelular polisacárido), el cual media la adhesión célula-célula [40].

Las biopelículas microbianas han sido asociadas con una gran cantidad de infecciones persistentes que responden pobremente a la terapia convencional de antibióticos, fenómeno ampliamente relacionado con una expresión elevada de genes codificantes de proteínas transportadoras, factores de virulencia y circuitos de quórum sensing con el propósito de cambiar el ambiente local [41]. En este aspecto, la matriz de exopolisacáridos juega también un papel fundamental ya que representa una barrera de difusión del transporte de moléculas al interior de la biopelícula. El exopolisacárido se encuentra negativamente cargado y restringe la penetración de los patrones químicos cargados positivamente de antibióticos mediante interacciones químicas o enlaces moleculares. Lo anterior contribuye a diluir la concentración de los antibióticos antes de alcanzar las paredes bacterianas en la biopelícula [42].

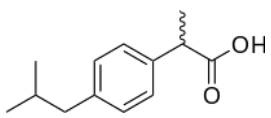
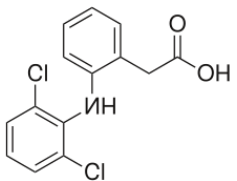
2.3.1. Inhibición de formación de biopelículas

La prevención de formación de biopelículas en los dispositivos médicos es buscada a través de la utilización de agentes antimicrobianos bactericidas o bacteriostáticos o aún con el empleo de agentes desprovistos de acción antimicrobiana pero que interfieran o inhiban la adhesión bacteriana [19].

La combinación de agentes físicos y químicos en el control de formación de biopelícula es cada vez más contemplada una vez que aún no se conoce un método o compuesto único que sea capaz de hacerlo de manera efectiva [43]. Una nueva estrategia que podría ser utilizada para la inhibición de formación de biopelícula por *E. coli* es el revestimiento de catéteres urinarios con fármacos AINES, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y diclofenaco, una vez que se ha demostrado su capacidad para reducir la formación de biopelículas, disminuyendo el número de células vivas o modificando la estructura de la biopelícula [44, 45].

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos principalmente antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos. Todos ejercen sus efectos por acción de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Dentro de este grupo variado se pueden clasificar los fármacos según su naturaleza y estructura química, según deriven estructuralmente; así el ibuprofeno es un derivado arilpropionico y el diclofenaco es un derivado arilo-acético.

Tabla 1. Estructura de Ibuprofeno y Diclofenaco

Ibuprofeno	derivado arilpropionico	
Diclofenaco	derivado arilo-acético	

2.4. Quorum sensing en *E. coli* y *K. pneumoniae*

Como ya se mencionó antes, la comunicación bacteriana depende de una serie de moléculas pequeñas, conocidas en la actualidad como moléculas señalizadoras. Se han identificado varios tipos de moléculas señalizadoras, siendo las acil homoserina-lactonas (AHL), que regulan los sistemas de QS en bacterias Gram-negativas. Sin embargo, el circuito de QS en *E. coli* son dirigidos por furanosil borato diéster o autoinductor-2 (AI-2) [46].

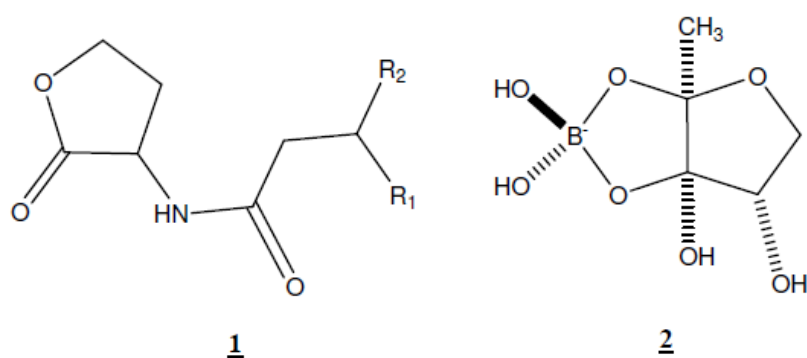


Figura 1. Compuestos señalizadores de los sistemas de QS: 1. N-acilhomoserina lactonas (AHL) (R1 corresponde a la cadena alifática y R2 son los grupos sustituyentes que puede tener la cadena tales como: grupos oxo, e hidroxilo). 2. AI-2: furanosil borato diéster

Los circuitos de QS funcionan de la siguiente manera (Figura 2): Las moléculas señalizadoras, sintetizadas por la sintasa tipo LuxI, se producen basalmente por las bacterias; cuando la población bacteriana alcanza la densidad suficiente (quorum), las moléculas señalizadoras acumuladas se unen establemente a la proteína tipo LuxR (un factor de transcripción). Este complejo regula tanto la expresión de la sintasa LuxI, generando una retroalimentación por incremento de la producción de las AHL, como la activación de la transcripción de los genes regulados por los promotores tipo Plux lo que conlleva a la expresión de determinados fenotipos [47].

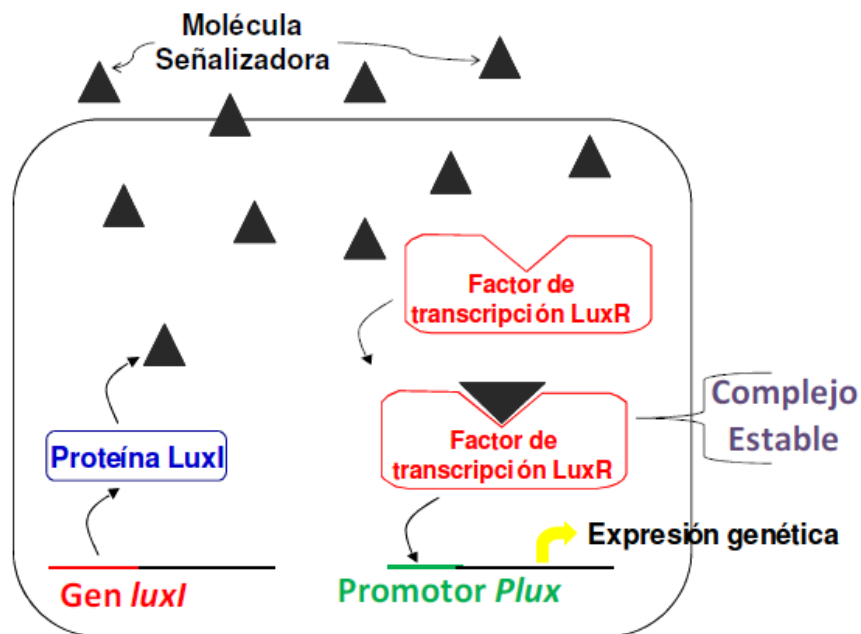


Figura 2. Circuito de Quorum sensing, producción de molécula señalizadora y expresión genética.

El papel de las AHL en el control de la expresión de genes de virulencia se ha investigado intensamente en *P. aeruginosa*, un patógeno humano oportunista que produce un amplio espectro de factores de virulencia y metabolitos secundarios. El organismo es comúnmente responsable de infecciones de las vías respiratorias en quística pacientes con fibrosis, así

como la sangre, piel, ojo, intestino e infecciones del tracto genitourinario en pacientes inmunocomprometidos por cirugía. Ahora está claro que la regulación de los genes para muchos factores de virulencia está mediada en diversos grados a través de QS [48]. Cepas de *E. coli* regulan su expresión de genes de virulencia en respuesta a una variedad de factores ambientales y puede utilizar QS para modular la expresión génica. Los principales factores de virulencia son fimbrias que median la adhesión bacteriana que permiten su colonización y proliferación.

En *E. coli*, tres circuitos de detección de quórum se han descrito, SdiA, AI-2 y los sistemas de AI-3. Con la excepción del sistema de AI-3, los otros dos circuitos han sido relativamente bien caracterizado [49]. Con múltiples sistemas de quórum sensing en *E. coli*, es poco probable que cada uno exista independientemente sin ninguna interacción. Recientemente, se descubrió una proteína de dominio EAL para facilitar la interacción entre sistemas SdiA y AI-2 a través de la regulación de cAMP [50]. Sin embargo Taghadosi *et al.*, 2015 ha demostrado la participación de circuitos de AHL cepas de *E. coli* uropatógenas [48].

En *K. pneumoniae*, dos sistemas de quórum sensing se han descrito en la literatura. La molécula AI-2 fue, durante muchos años, el único regulador reconocido de la comunicación de célula a célula en esta bacteria. La síntesis de AI-2 y la maduración de la biopelícula, a través de la regulación del aumento de la producción de lipopolisacárido, eran esencialmente *LuxS* dependiente [49]. En cuanto al mecanismo mediado por AHL, se descubrió recientemente de un estudio de perfiles de lengua humana dorsal. Los análisis de espectrometría de masas de alta resolución reveló que N-octanoil-homoserina lactona (C8-AHL) y N-3-dodecanoil-L-homoserina lactona (C12-AHL) son las moléculas AHL producidas por *K. pneumoniae*. Desafortunadamente, el componente receptor específico no se determinó en ambos mecanismos [51].

3. METODOLOGÍA

3.1 Aislamiento bacteriano y pruebas de susceptibilidad

Un total de 100 aislamientos de enterobacterias fueron obtenidos de muestras de orina provenientes de pacientes con infección del tracto urinario atendidos en instituciones prestadoras de servicios de salud ubicadas en la ciudad de Cartagena. Las muestras fueron recolectadas en condiciones asépticas en recipientes estériles y transportados a 4°C inmediatamente al laboratorio de microbiología de la Universidad de Cartagena, sede San Pablo.

Las cepas fueron aisladas de acuerdo con el protocolo de Mehta [52], con la técnica semi-cuantitativa. Se usó un asa bacteriológica calibrada estándar de orina para transferir los 0,01 mL de muestra de orina a medios de cultivo tipo agar sangre y agar MacConkey, además las cepas control en agar EMB. Después que la orina fue absorbida en el agar, las placas se invirtieron y se incubaron a 37° C durante 18-24 h. Luego se realizaron varios repiques de estas cepas.

Todas las cepas colectadas fueron identificadas por el método automatizado de MicroScan. Para corroborar los resultados se realizó la tinción de Gram y las pruebas bioquímicas estándar para la familia *Enterobacteriaceae*, como la prueba de indol para determinar la habilidad del microorganismo de romper el indol del aminoácido triptófano (Los resultados positivos se muestran por la presencia de un color rojo o rojo-violeta en la superficie de la capa de alcohol en el cultivo. Un resultado negativo se muestra amarillo), prueba de Simmons para diferenciar enterobacterias con capacidad de utilizar citrato como única fuente de carbono y energía (positivo: crecimiento y color azul; negativo: el medio permanece de color verde), prueba de rojo de

metilo para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa (La aparición de un color rosado constituye una reacción positiva indicadora de la presencia de acetoina, producto de la fermentación de la glucosa) y prueba agar triple hierro azúcar (TSI) para la diferenciación de enterobacterias según fermenten o no glucosa, fermenten o no lactosa o sacarosa, produzcan o no ácido sulfhídrico, produzcan o no gas.

La susceptibilidad antimicrobiana se llevó a cabo por el método de MicroScan, utilizando un Neg Urine Combo Panel Type 60 (NUC60) con *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como cepas control. Los resultados se interpretaron según la recomendación del CLSI.

3.2 Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

La producción de betalactamasas fue detectada por el test de sinergia de doble disco (DDST), se utilizó discos de ceftazidima, cefotaxima, ceftriazona y aztreonam (30µg) cada uno, a una distancia de 20 mm (centro a centro) de un disco con amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg/ml) en el centro de una placa de Mueller Hinton, a las 24 horas se observaron las siguientes características en las placas de cultivo: efecto de huevo, cola de pez o balón de fútbol americano. El sinergismo observado entre algunas de las cefalosporinas y la amoxicilina/ácido clavulánico expresa la producción de BLEE [53, 54].

Como técnica confirmatoria para la producción de betalactamasas se utilizó la concentración mínima inhibitoria (CMI) [55], y su interpretación se realizó siguiendo las recomendaciones de CLSI 2010. Para esto, a todas las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* se les determinó CMI preparando una suspensión bacteriana de 0,5 en la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), luego se

colocaron los sensidiscos (Oxoid, Cambridge, UK) correspondientes a los antibióticos para microorganismos gram negativos (ceftriaxona, cefotaxima, aztreonam, ceftazidima y amoxicilina/ácido clavulánico). Las placas de agar Mueller Hinton (Oxoid, Cambridge, UK) fueron incubadas por 24 horas a 37°C; luego se interpretaron los halos de inhibición y se reportaron como “sensible” “intermedio” o “resistente” de acuerdo con las normas de CLSI 2013. Ver Tabla 2

Tabla 2. Interpretación de los halos de inhibición de acuerdo a las normas CLSI 2013.

		Halos de inhibición (mm)		
Discos	Antibióticos	Sensible	Intermedio	Resistente
CRO	Ceftriaxona	≥23	20-22	≤19
CTX	Cefotaxima	≥26	23-25	≤22
AZM	Aztreonam	≥21	18-20	≤17
CAZ	Ceftazidima	≥21	18-20	≤17
AMC	amoxicilina/ac. Clavulanico	≥18	14-17	≤13

Se calculó el índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR) para cada cepa, el cual se define como a/b, donde "a" representa el número de antibióticos para los cuales determinada cepa presenta resistencia, y "b", el número de antibióticos al cual se expuso dicha cepa. Un índice mayor a 0.2 indica que la bacteria presenta resistencia múltiple[48].

3.3 Cuantificación de la formación de biopelículas

La capacidad de formar biopelículas se determinó por microtitulación en placas de 96 pozos como lo describe O'Toole y Kolter *et al.*, 2008 [56]. Todos los aislamientos se incubaron durante la noche en agar nutritivo (Merck, Alemania) a 37°C; luego, las cepas se cultivaron durante 24 horas en 1 mL de medio Luria Bertani (LB) (Merck, Alemania) a 37°C. Seguidamente, 10 µL de la suspensión de bacterias se transfirió a placas de poliestireno de 96 pozos con 190 µL de LB, por cada ensayo que se realizó por triplicado.

Posteriormente, las placas fueron incubadas sin agitación durante 24 horas a 37°C. La placa se lavó cuidadosamente tres veces con tampón fosfato salino pH 7.2 para remover las bacterias poco adheridas. Se retiró el exceso de tampón y los pozos se secaron al aire durante 10 minutos. Luego, las biopelículas fueron teñidas con 200 µL de cristal violeta (CV) 0,5% en agua a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución de CV se retiró por inversión de la placa y los pocillos se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Por último, se agregaron 200 µL de una solución alcohol: acetona 80:20, se incubó a 37°C durante 15 minutos y se midió la densidad óptica en un lector de placas a una longitud de onda de 492 nm. Se utilizó medio LB sin inocular como control.

Las cepas se clasificaron en no formadora, débil, moderada y fuerte formadora de biopelículas según los criterios expuestos en la tabla 3 [57]:

Tabla 3. Criterios para la clasificación de las cepas bacterianas según su capacidad formadora de biopelículas.

Clasificación	Criterio
No productora de biopelícula	$DO \leq DOc$
Débil productora de biopelícula	$DOc < DO \leq (2*DOc)$
Moderada productora de biopelícula	$(2*DOc) < DO \leq (4*DOc)$
Fuerte productora de biopelícula	$DO > (4*DOc)$

DO: Densidad óptica de la muestra DOc: Densidad óptica del control

3.4 Extracción y cuantificación de N-acil-homoserina lactonas (AHL)

La extracción y cuantificación de la actividad acil homoserina lactona se realizó como lo describe Taghadosi *et al.*, 2015 [39]. Para esto, los aislados se incubaron en 5 mL de agar LB durante la noche a 37°C, luego se tomó 1.5 mL de la suspensión y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos, se transfirió el sobrenadante y se repitió este paso dos veces. Posteriormente se realizó la extracción líquida-líquida usando acetato de etilo durante 10 minutos y se separó la fase orgánica (superior). Seguidamente, las muestras se secaron a 40°C, se transfirieron 40µL a una microplaca y se agregó 50µL de solución 1:1 de hidroxilamina 2M: NaOH 3.5M y 50µL de solución 1:1 de FeCl₃ 10% en HCl: Etanol 95%. Por último, se midió la densidad óptica a 520nm en un lector de placas.

3.5 Identificación de N-acil-homoserina lactonas (AHL)

Una vez se determinó que las bacterias objeto de estudio poseían circuitos de QS mediados por AHL, se realizaron cultivos de éstas, para posteriormente realizar la extracción líquida – líquida del sobrenadante del cultivo con acetato de etilo. La identificación de las moléculas señal se

realizó por FT-IR, identificando los grupos funcionales de N-acil homoserina lactona. El extracto de AHL obtenido se utilizó para someter las muestras a IR en un Espectrofotómetro FTIR – 8400S (Shimadzu) [58].

3.6 Inhibición de la formación de biopelículas

Se evaluó el efecto de ibuprofeno (IBU) y diclofenaco (DIC), patrones obtenidos del Laboratorio de Análisis de Medicamentos (LAM) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena; sobre la formación de biopelícula por 5 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* identificadas previamente como fuertes formadoras de biopelícula y las cepas ATCC como control.

Los efectos de los compuestos en solución sobre la capacidad de formar biopelículas fueron estudiados utilizando concentraciones de 2, 8, 30 y 125 mg/L de IBU y 5, 15, 30 y 50 mg/L de DIC; concentraciones sub-CMI como lo reporta Naves, *et al.*, 2010 y Reśliński *et al.*, 2013. Tras llevar a cabo la incubación en caldo LB a 37°C durante 24 horas, se transfirió 10 µL de la suspensión a placas de poliestireno de 96 pozos con 180 µL de LB. Luego se añadió 10 µL de solución con los tratamientos y se incubó por 24 horas a 37°C. Los lavados, tinción de la biopelícula y posterior lectura fue realizada como se describió anteriormente en el apartado 3.3. Cepas no tratadas fueron usadas como control negativo [56].

Se definió la concentración mínima inhibitoria de biopelícula (CMIB) como la concentración más baja del compuesto que produjo una reducción significativa en la formación de la biopelícula comparada a los pocillos control [59].

3.7 Análisis estadístico

Las variables cuantitativas generadas fueron analizadas descriptivamente, se calculó medias, desviaciones estándar y errores estándar de la media.

Los efectos de los compuestos en la formación de biopelículas son expresados como el porcentaje del índice de formación de biopelícula (promedio \pm EEM) y fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de Dunnett post hoc para comparaciones múltiples. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas

Se obtuvieron 100 aislados clínicos a partir de muestras de orina provenientes de pacientes con ITU. El 72% de los pacientes fueron mujeres y el tipo de muestra que predominó fue la micción espontánea (54%). Las cepas aisladas fueron identificadas mediante ensayos bioquímicos y confirmadas por el método de MicroScan (Figura 3).

Tabla 4. Características de identificación de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

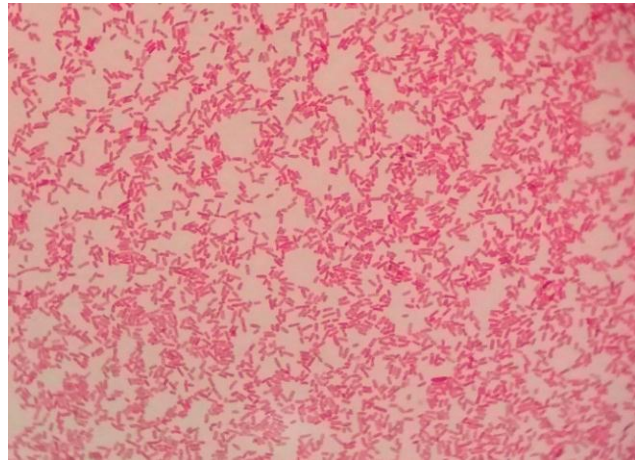
Muestras extraintestinales		<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Motilidad		+ve ^a	-
Características de las colonias.	Agar EMB	Brillo metálico verde.	Mucosas, rosa púrpura, confluentes
	Agar MacConkey	Rosadas, circular	Rosadas, irregulares. Mucoides
Morfología y disposición		Bacilo corto, solo, en pareja o de cadena corta.	Bacilos cortos, sin agrupación definida
Propiedades de la tinción de Gram		Gram negativas	Gram negativas

^a Resultados de la prueba basada en la motilidad. Mas (+) indican reacción positiva.

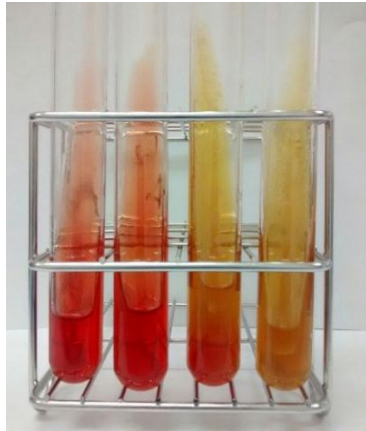
Tabla 5. Pruebas bioquímicas usadas para identificación de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Aislamientos	Prueba bioquímica	Reacción^a
<i>Escherichia coli</i>	Catalasa Agar triple azúcar TSI Producción de indol Rojo de metilo	Positivo
	Ureasa Voges proskauer Citrato de simmon's H ₂ S	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Catalasa Agar triple azúcar TSI Ureasa Voges proskauer Citrato de simmon's	Positivo
	H ₂ S Producción de indol Rojo de metilo	Negativo

^a Resultados basados en los tipos de utilización de sustratos



A



B



C



D

Figura 3. Identificación de las cepas. **A.** Tinción de Gram. **B.** Prueba de rojo de metilo. **C.** Prueba de Simmons. **D.** panel de MicroScan

El 83% de las cepas aisladas correspondió a *E. coli* y el 17% restante de las cepas fueron *K. pneumoniae* como se puede observar en la Figura 4. Otros estudios como los realizados por Akram *et al.*, 2007 y Bano *et al.*, 2012 sobre infección urinaria también mostraron que *E. coli* y *Klebsiella spp.* son los uropatógenos más frecuentes en ITU [60, 61].

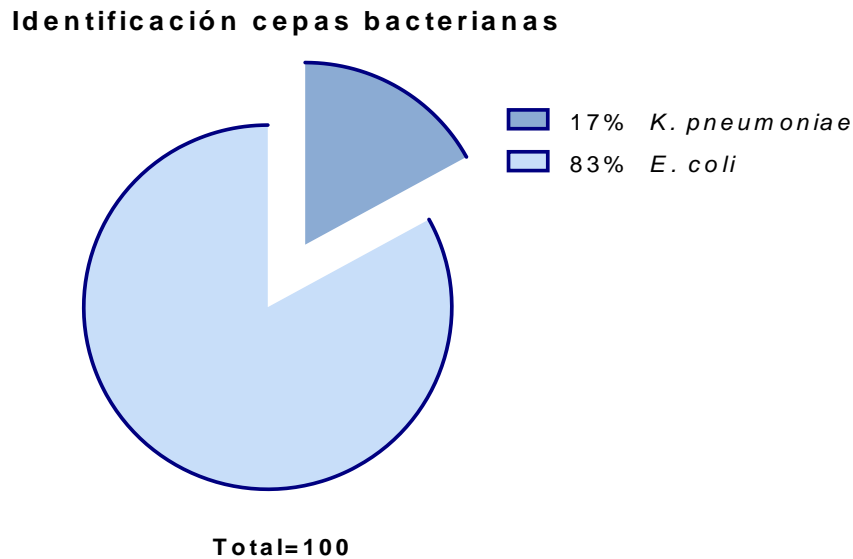


Figura 4. Identificación de las cepas bacterianas aisladas.

Además, se realizó la identificación de las cepas *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Del 83% de las cepas identificadas como *E. coli*, se encontró que el 12.05% fueron productoras de BLEE. Así como para el total de las cepas *K. pneumoniae* (17%), el 11.76% fueron cepas productoras de BLEE (Figura 5). Un estudio realizado por de Paz *et al.*, 2015 reporta una mayor prevalencia de cepas *E.coli* productoras de BLEE a la encontrada en esta investigación con un 21.5% [62]. Así como se ha reportado que la prevalencia global de *K. pneumoniae* productora de BLEE es de 17.7% [63].

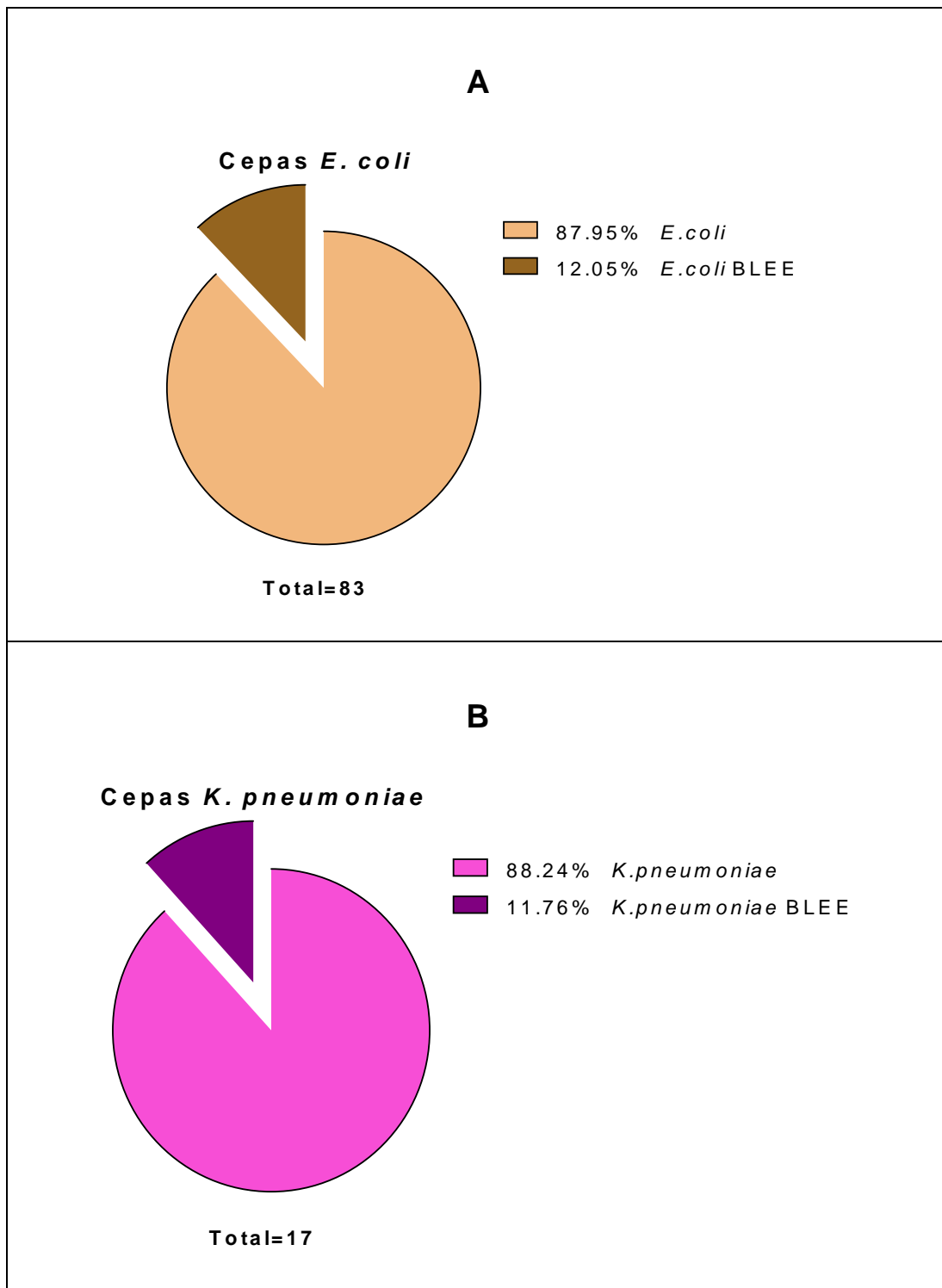


Figura 5. A. Porcentaje de cepas *E. coli* y *E. coli* BLEE. **B.** Porcentaje de cepas *K. pneumoniae* y *K. pneumoniae* BLEE.

4.2. Patrones de susceptibilidad a antibióticos.

Los resultados del antibiograma realizado en el panel de MicroScan (Fig. 6), muestran que solo 6 de los 22 antibióticos evaluados (amikacina, doripenem, ertapenem, meropenem y las combinaciones cefotaxima/ ácido clavulánico, ceftazidima/ ácido clavulánico) fueron efectivos frente a más del 95% de las cepas evaluadas.

Se puede observar que la mitad de los antibióticos evaluados presentaron un grado de resistencia entre el 40 a 50% de las cepas, e incluso para antibióticos de uso frecuente como el ciprofloxacino y la ampicilina, se encontró que el 55 y 75% respectivamente de las cepas presentaron resistencia. Además, se identificaron alrededor del 20% de cepas con BLEE por lo que fueron resistentes a los antibióticos como el aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriazona.

Una investigación realizada por Prakash et al., 2013, reporta datos similares a los obtenidos, donde la mayor resistencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* es frente a antibióticos como el ciprofloxacino, ceftazidima, cefotaxima y ceftriazona. Así como también son muy sensibles a antibióticos carbapenémicos como el meropenem e imipenem y al aminoglicosido amikacina [15].

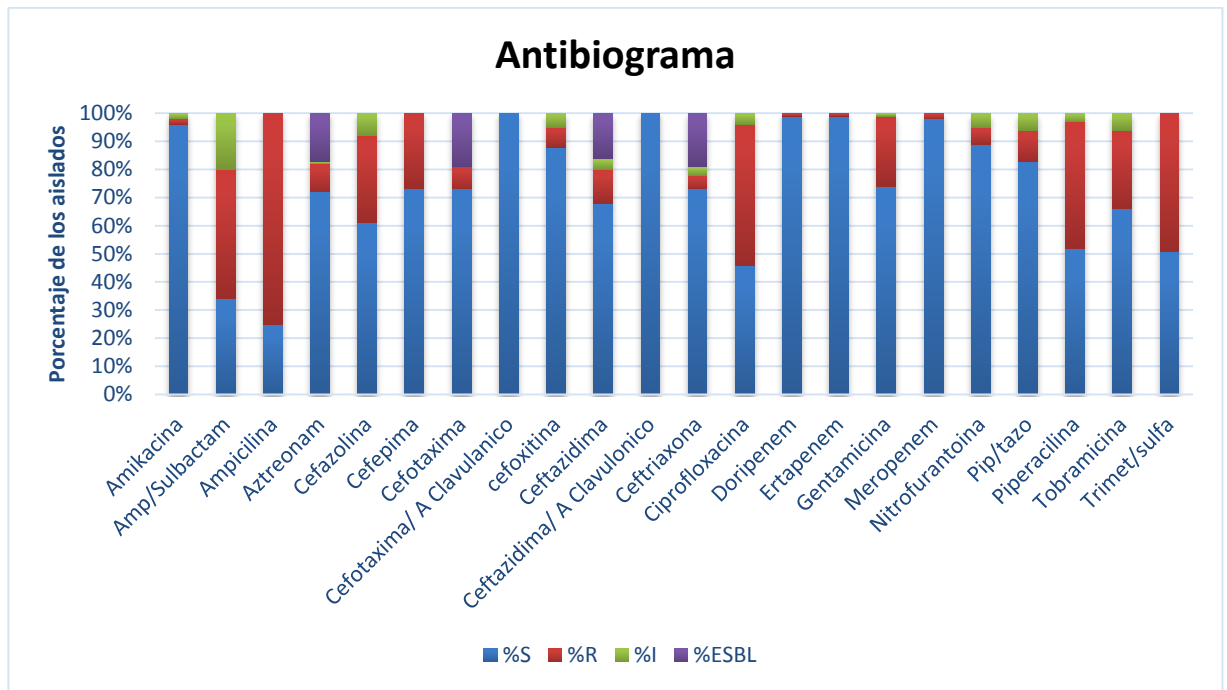


Figura 6. Prueba de susceptibilidad a antibióticos mediante el método de MicroScan.

Se determinó la CMI midiendo los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, resultados que se pueden observar en la figura 7. El 60% de las cepas fueron sensibles a antibióticos como ceftriaxona, aztreonam y ceftazidima. Para la cefotaxima y amoxicilina/ ácido clavulánico se encontró un porcentaje menor, 42% y 45% respectivamente. Así como, más del 20% de las cepas fueron resistentes frente a estos antibióticos, resaltando la cefotaxima, en el cual el 40% de las cepas fueron resistentes y 20% intermedio.

Estos datos son confirmatorios del antibiograma realizado por el panel de MicroScan, obteniendo nuevamente, resistencias en el 60% de las cepas frente al grupo de antibióticos evaluados en comparación con el 55% obtenido en el antibiograma. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Arce et al., 2012 donde se encontró que la resistencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* aislados de pacientes con ITU frente a ceftazidima,

cefotaxima, ceftriazona y aztreonam están alrededor de 40%, 45%, 32% y 20% respectivamente [53, 57].

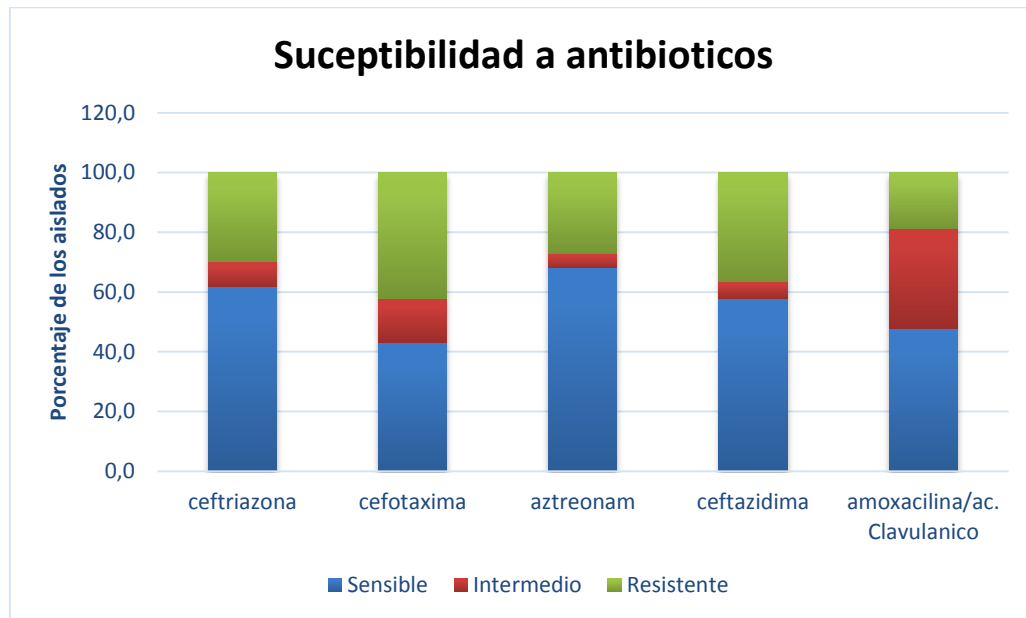


Figura 7. Concentración mínima inhibitoria mediante sensidiscos.

El índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR) fue determinado para cada una de las cepas. El 65% de las cepas evaluadas presentaron un índice ≥ 0.2 , lo que indica que la bacteria presenta resistencia múltiple [48]. Estos resultados tienen una enorme repercusión a la hora de seleccionar el tratamiento empírico de estas infecciones, ya que, en general, *E. coli*, como en otros estudios [64, 65], muestra una elevada tasa de resistencias a la mayor parte de los antibióticos de mayor uso clínico. El uso de antibióticos con limitada actividad antimicrobiana en las ITU se asocia con menor eficacia clínica en pielonefritis, con mayor número de fallos y menos eliminación, y en infecciones graves se asocia con mayor mortalidad, por lo cual hay que evitarlos como tratamiento empírico inicial de estas infecciones [66].

La elección del tratamiento antibiótico para la ITU debe de estar basada en los resultados del urocultivo y el antibiograma. Sin embargo, en las situaciones en las que los síntomas o el estado clínico del paciente no permiten esperar a obtener esta información, es importante conocer cuál es el antibiótico a utilizar empíricamente en este periodo inicial, esto apoyado en el conocimiento de la resistencia local al tratamiento [55]. Según estos resultados, se sugiere que el esquema de tratamiento de pacientes con ITU en nuestra comunidad debe ir orientado al uso de fármacos carbapenémicos, así como la combinación de cefotaxima/ ácido clavulánico ó ceftazidima/ ácido clavulánico. También, el uso del aminoglucósido amikacina tendría bastante sentido, sin embargo se debe tener en cuenta el riesgo de ototoxicidad y nefrotoxicidad con este último, así como la localización de la ITU, si es adulto o niño, si hay embarazo o no y de esta manera individualizar al paciente. Pero estos resultados marcan un punto de referencia para posteriores investigaciones *in vivo*, que aporten mayor conocimiento que permita realizar recomendaciones con mayor evidencia sobre el esquema de tratamiento.

4.2 Detección fenotípica de BLEE

En la Figura 8 se muestran los efectos de sinergismos presentados en algunas cepas con fenotipo BLEE frente a los antibióticos evaluados. La presencia de BLEE fue manifestado por el efecto sinérgico del inhibidor amoxicilina/ ácido clavulánico en el centro de la placa y los discos de ceftazidima, cefotaxima, ceftriazona y aztreonam formando efecto de huevo, cola de pez y balón de futbol americano [16].

En los últimos años las β -lactamasas de espectro extendido descritas recientemente en gramnegativas, han emergido como un mecanismo de resistencia. Desafortunadamente el uso extensivo de antibióticos es la causa

de esta resistencia y el manejo de estas infecciones se convierte en un problema serio [53].

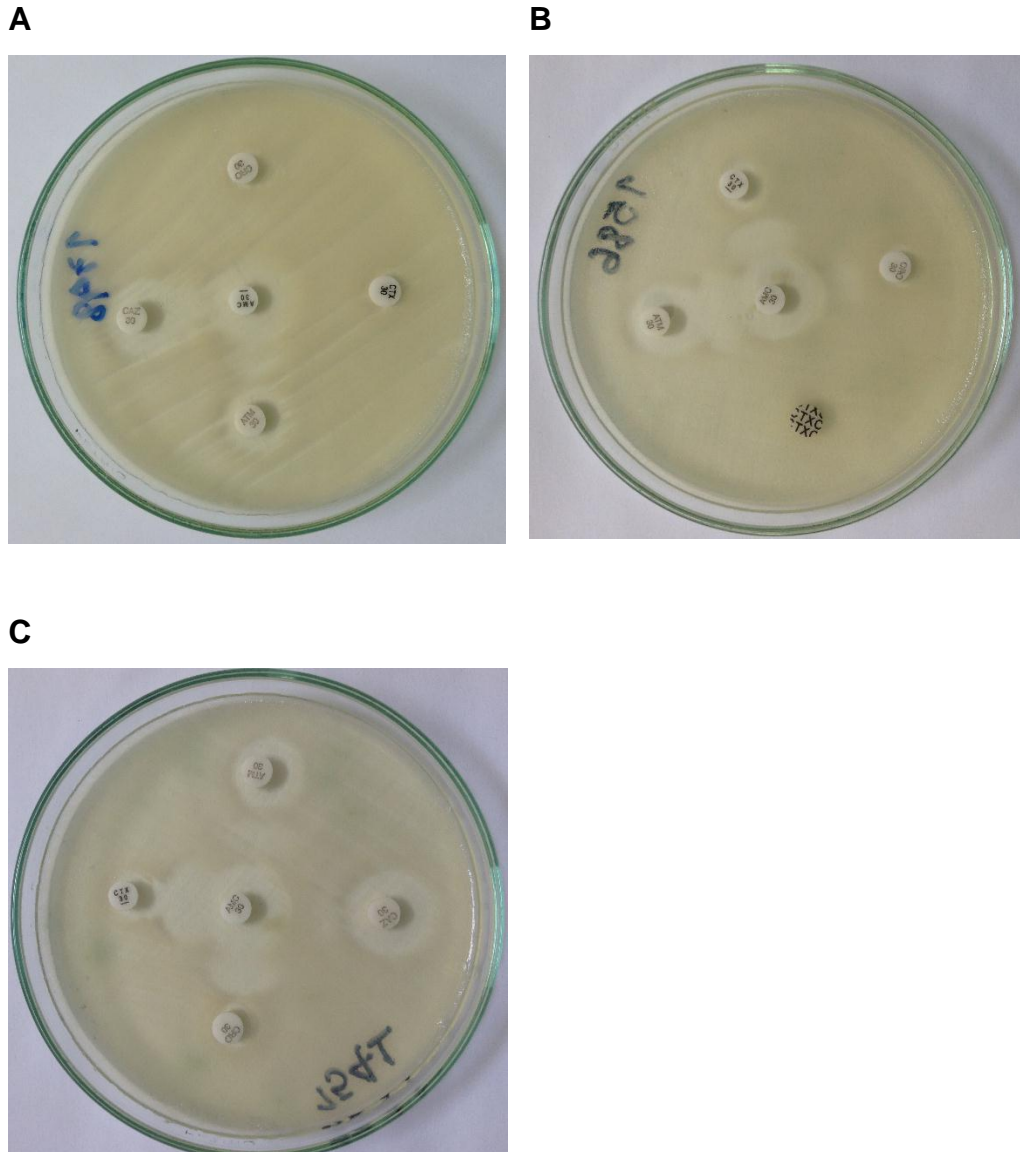


Figura 8. Detección fenotípica de BLEE **A.** Efecto balón de futbol americano **B.** Efecto de cola de pez y balón de futbol americano **C.** Efecto de huevo y balón de futbol americano.

4.3 Cuantificación de la formación de biopelículas

La formación de biopelículas se determinó midiendo la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 492 nm (Figura 9)

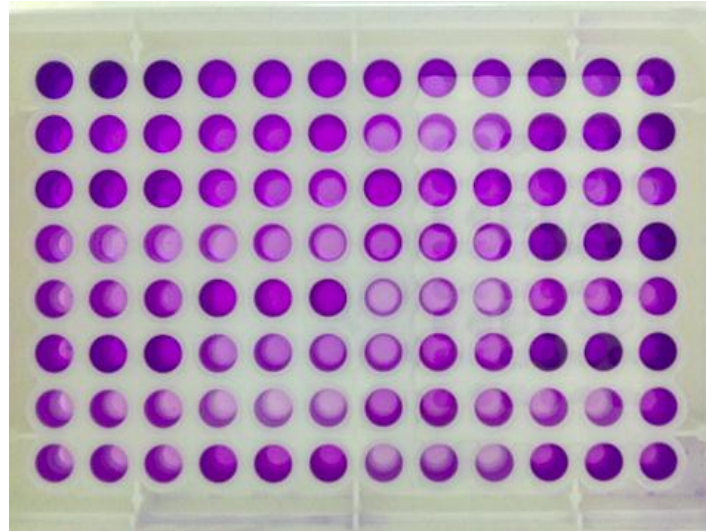






Figura 9. Formación de biopelículas de cada cepa. Ensayo en microplacas.

. Capacidad fuerte. . Capacidad moderada. . Capacidad leve.
. No adherente.

La cuantificación de la capacidad para formar biopelículas mostró que el 1% de los aislados clínicos no forma biopelícula, 45% de las cepas exhibieron débil capacidad para formar biopelículas y 49% mostraron actividad moderada. 5% de los aislados resultaron con fuerte capacidad para formar biopelículas (Fig. 10). Es importante resaltar que para este estudio, el 99% de las cepas analizadas presentaron actividad formadora de biopelículas en algún grado. De las cepas con fuerte capacidad para formar biopelículas hay 3 de *E. coli* y 2 de *K. pneumoniae*.

Las cepas utilizadas como control *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 presentaron débil capacidad formadora de biopelículas. En un estudio previo Merritt et al., 2000, observaron que la cepa *E. coli* ATCC no

era capaz de adherirse y formar biopelícula en poliestireno cuando se cultivaba en un caldo rico (TSB) [67].

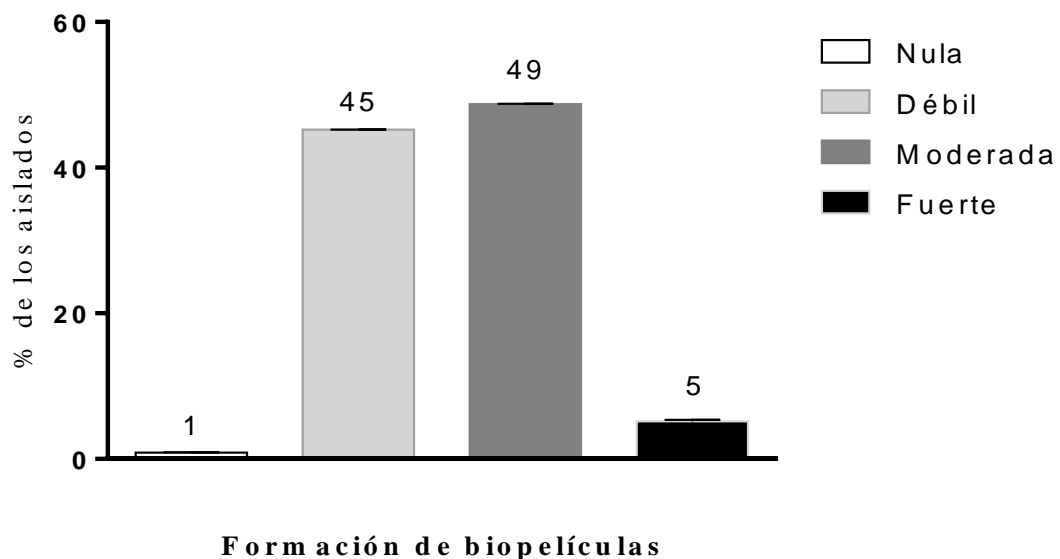


Figura 10. Clasificación de los aislados según su capacidad para formar biopelículas.

En otros estudios realizados sobre resistencia bacteriana y formación de biopelículas en *E. coli* y *Klebsiella spp.* se puede observar la misma tendencia en la distribución de los grupos. Shikh-Bardsiri et al., 2013, reportan en su estudio que para un total de 88 aislados los porcentajes de cepas no formadoras y con débil, moderada y fuerte capacidad productora de biopelículas fueron de 6.8%, 36%, 39.7% y 17,4% respectivamente [68].

Por otro lado, se observó una relación entre la formación de biopelícula y la resistencia a antibióticos, ya que la mayoría de las cepas con resistencia múltiple, son las mismas que presentaron densidades ópticas más altas por

la formación de biopelículas, es decir las cepas con capacidad formadora de biopelícula moderada y fuerte. Esta relación, multirresistencia – formación de biopelículas ya ha sido reportada por López et al., 2008 y Hiraes-Casillas et al., 2009 [69, 70], por ello su importancia en el ámbito clínico para realizar un adecuado manejo del paciente.

4.4 Cuantificación de actividad AHL

Para la cuantificación de AHL se midió la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 520nm (Figura 11). La actividad AHL fue nula o débil para aquellos aislados que presentaron una densidad óptica $\leq 0,98$. Las cepas que mostraron actividad AHL, son aquellas que resultaron fuertes formadoras de biopelículas (5 cepas), una de las cepas que está dentro de este grupo no sobrepasó el umbral de actividad AHL, sin embargo, estuvo cercano al límite con un valor de 0,962 (Figura 12). Las cepas control *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 presentaron valores de actividad AHL por debajo del umbral, 0,720 y 0,414 respectivamente.

Solo cuatro aislados mostraron actividad AHL por encima del umbral, la mayor actividad fue de 1,329 (*E. coli*), seguido de 1,190 (*E. coli*), 0,993 (*K. pneumoniae* y *E. coli*).

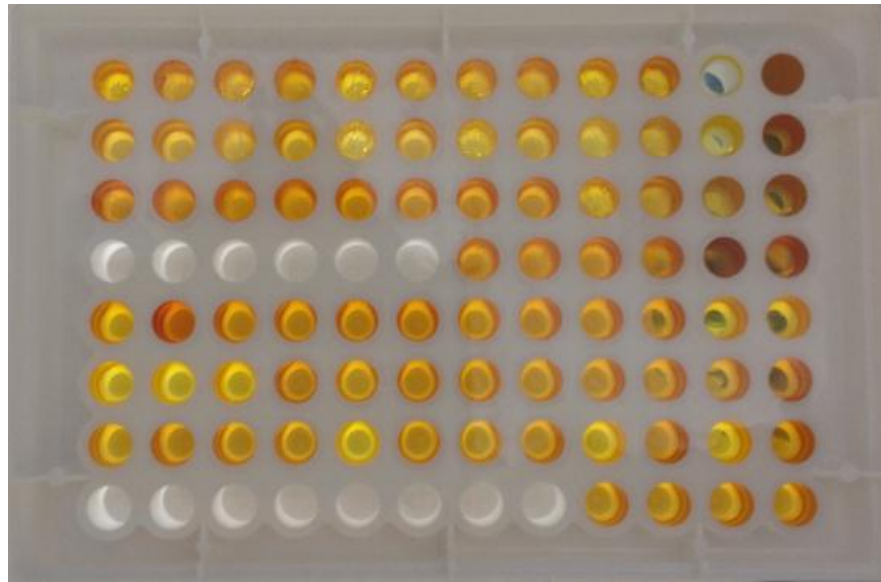
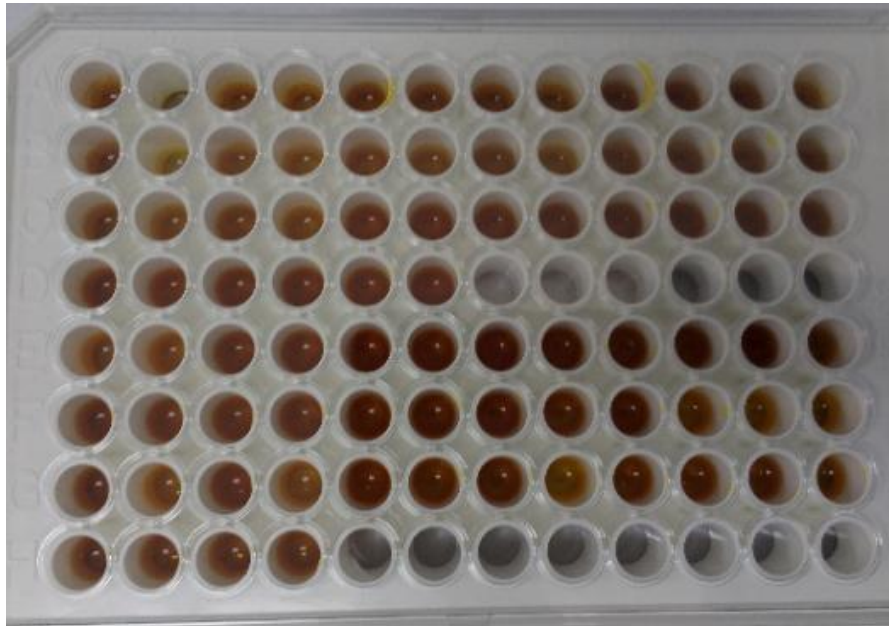


Figura 11. Extracción de acil homoserina lactonas (AHL) de cada cepa.

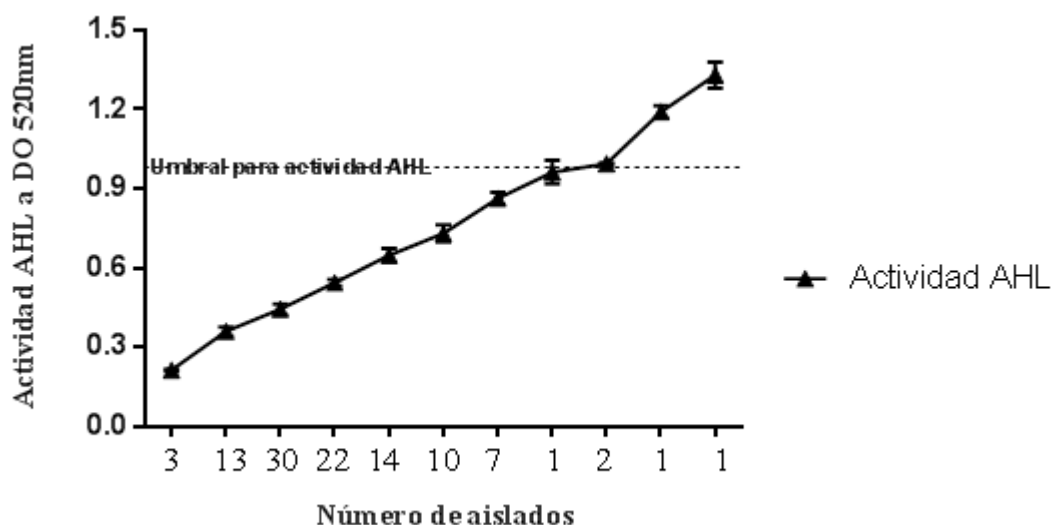


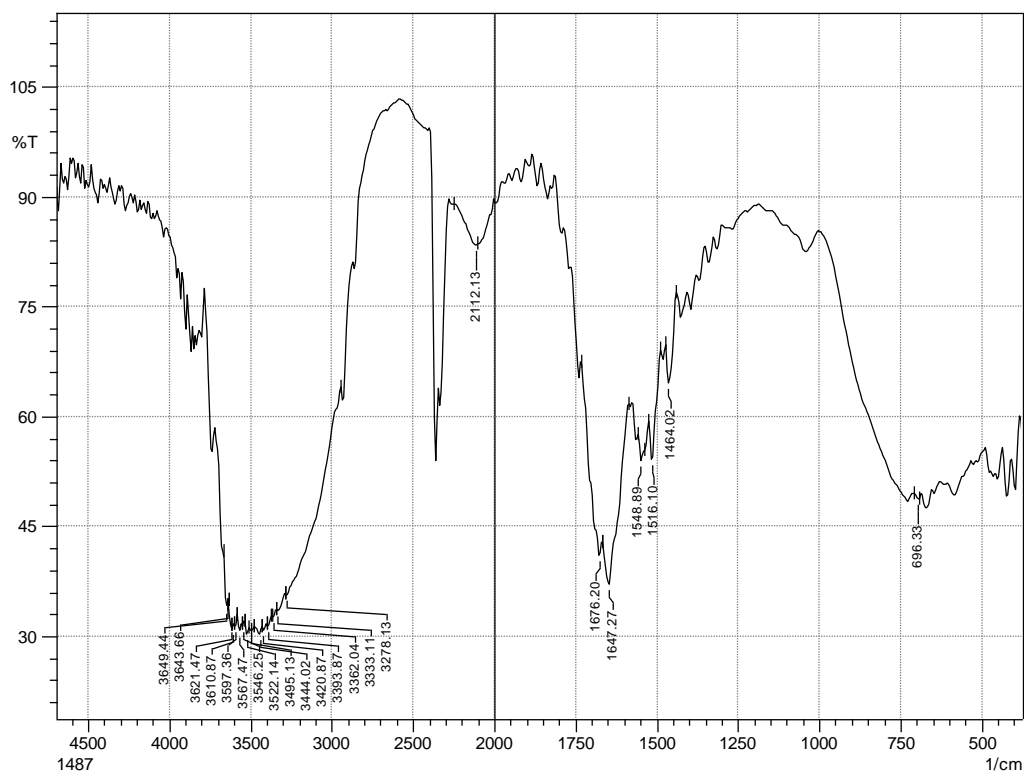
Figura 12. Actividad AHL de los aislados clínicos. Los resultados por debajo del umbral indican débil o nula actividad AHL.

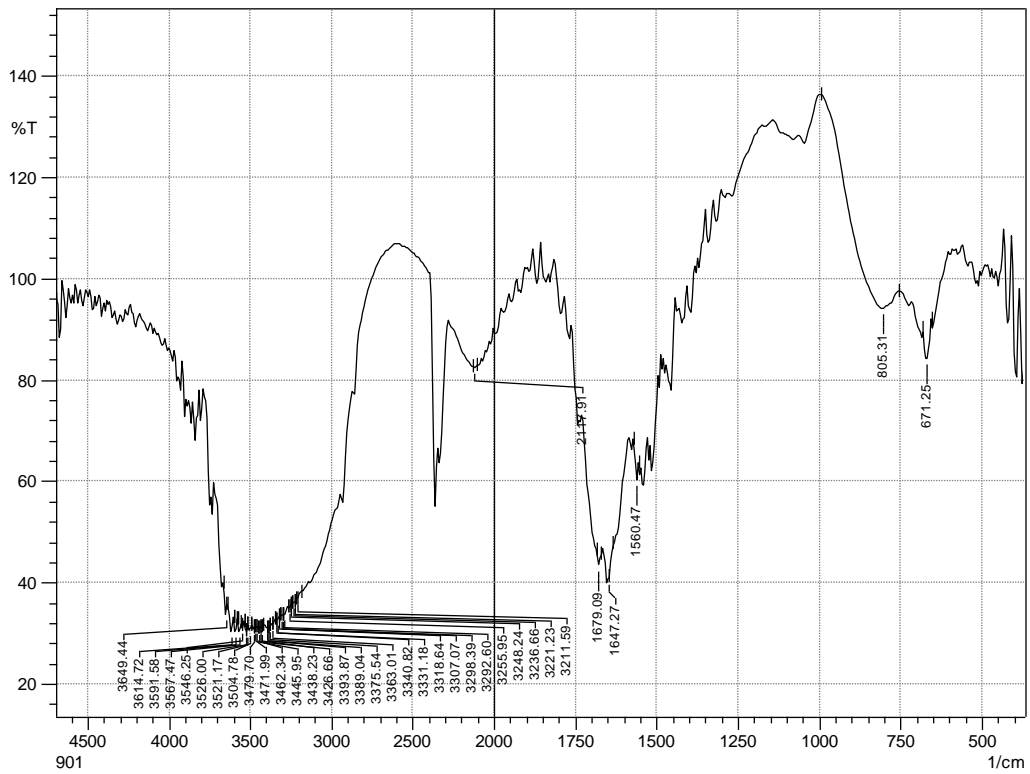
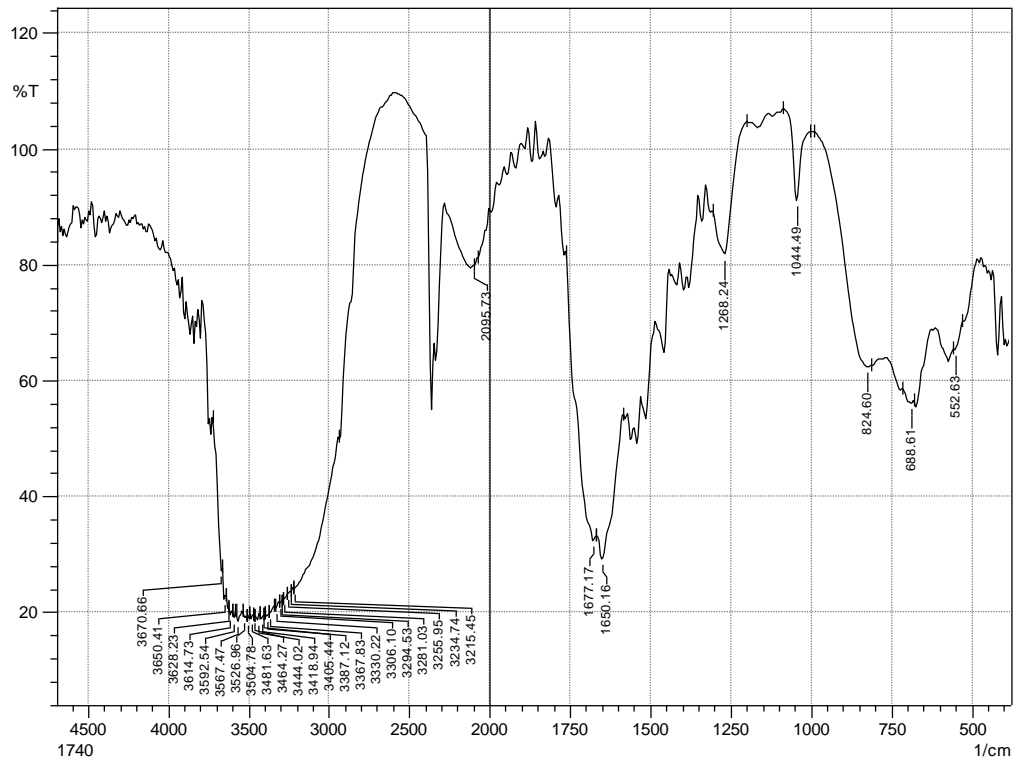
Varios estudios han reportado que *E. coli* no es capaz de producir AHL, sin embargo tiene la capacidad de alterar su patrón de expresión génica y las propiedades fenotípicas en respuesta a AHL mediante el regulador transcripcional sensible a AHL SdiA, de acuerdo con la presencia de otras poblaciones de bacterias Gram-negativas [71].

A pesar de que la asociación entre la formación de biopelícula y otros factores de virulencia ha sido variable, en el presente estudio se detectó formación de biopelículas en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* capaces de producir AHL en niveles relativamente altos. Ya se han reportado en estudios recientes por Taghadosi, *et al.*, 2015, cepas de *E. coli* uropatógenas productoras de biopelículas con capacidad de producir y comunicarse por medio de moléculas tipo AHL [39]. Se necesita más investigación para entender la genética molecular de este compuesto en *E. coli*.

4.5 Identificación de AHL por Espectroscopía infraroja (FT-IR)

Las cepas que demostraron las más altas actividades de AHL se seleccionaron para el análisis de sus grupos funcionales por espectroscopía FT-IR (Figura 13). El resultado muestra absorciones de carbonilo de amida I y II a 1547 y 1516 cm^{-1} , así como absorciones características cerca de 1678 y 1647 cm^{-1} asignables a la presencia de γ -lactona y carbonilos cetónicos. La banda para la vibración de flexión del enlace O = CN en 680 cm^{-1} [58, 72]. Estos resultados apoyan los datos de actividad AHL y confirman la presencia de un anillo de lactona en las cepas productoras de biopelícula con alta actividad AHL, sin embargo los espectros obtenidos para los extractos presentan bandas demasiado anchas y en algunos casos se solapan con otras bandas, debido a la presencia de otros compuestos en los extractos. Por lo que ésta técnica no permitió obtener resultados claros al parecer por las concentraciones bajas a las que se encuentran las AHL en el extracto [47].





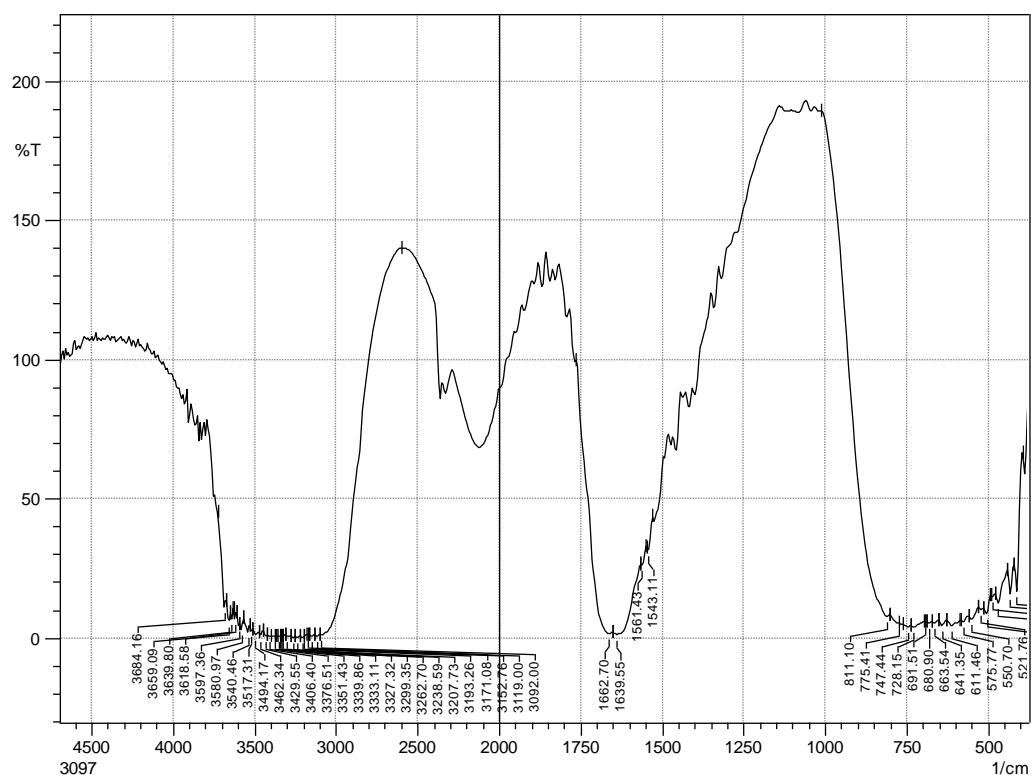


Figura 13. Espectros FT-IR de acil homoserina lactonas (AHL) de extractos obtenidos de sobrenadantes de cultivo de las cepas aisladas.

4.6 Inhibición de la formación de biopelículas.

Los efectos de los compuestos en la formación de biopelícula fueron expresados como porcentaje del índice de formación de biopelícula respecto a controles no tratados. Para excluir descenso en la formación de biopelícula debido a inhibición del crecimiento bacteriano, todos los compuestos se utilizaron a concentraciones subinhibitorias.

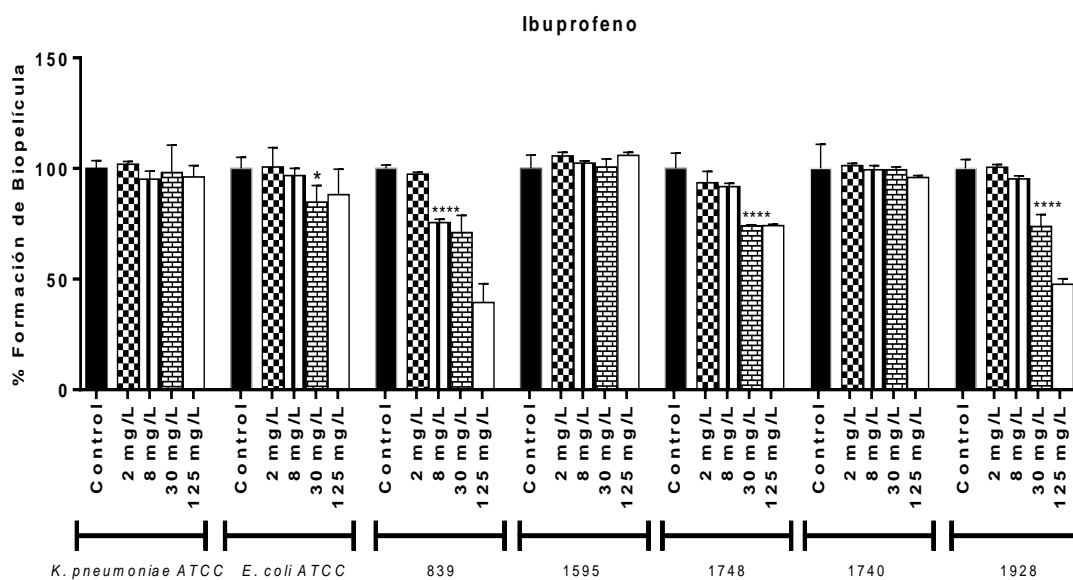


Figura 14. Efecto del ibuprofeno sobre la formación de biopelículas en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* fuertes formadoras de biopelícula.

IBU redujo la formación de biopelícula significativamente en tres de las cinco cepas, de las cuales dos son *K.pneumoniae* y una es *E. coli*, con CMIB de 8 y 30 mg/L, observándose disminuciones del 20 – 25%. Mientras que en algunos casos la presencia de la concentración más alta (125 mg/L) provocó drásticas reducciones en la formación de biopelícula, variando del 52.4% al 60.6%.

En 2010, Naves *et al.*, estudiaron los efectos del ibuprofeno sobre la formación de biopelículas en cepas de *E. coli*, identificadas como fuertes formadoras de biopelícula. En este estudio se encontró que la concentración de IBU obtenida en la orina obtenida bajo un esquema de tratamiento es mucho mayor que la concentración de IBU para disminuir la formación de biopelículas por cinco de los siete cepas de *E. coli* evaluadas. Por lo tanto,

IBU administrado en dosis estándar pudiera prevenir la formación de biopelícula por *E. coli* en sondas urinarias permanentes [45].

Un estudio realizado por Drago *et al.*, 2002, ha informado que las concentraciones sub-CMI de IBU inhiben la producción de fimbrias por cepas de *E. coli*, disminuyen la adhesión bacteriana a células uro-epiteliales. Por otra parte, la hidrofobicidad bacteriana y producción de hemolisina por cepas de *E. coli* también se ven afectados por incubación con el fármaco [73].

También, se ha demostrado un efecto anti-adherente de IBU en *Candida albicans* utilizando un modelo de disco en un sistema de catéter *in vitro* [74]. Además, algunos estudios *in vivo* han reportado efectos beneficiosos cuando se combina IBU y antibióticos para el tratamiento de la otitis media neumocócica experimental y en un modelo de rata de infección pulmonar crónica por *Pseudomonas aeruginosa* [75, 76].

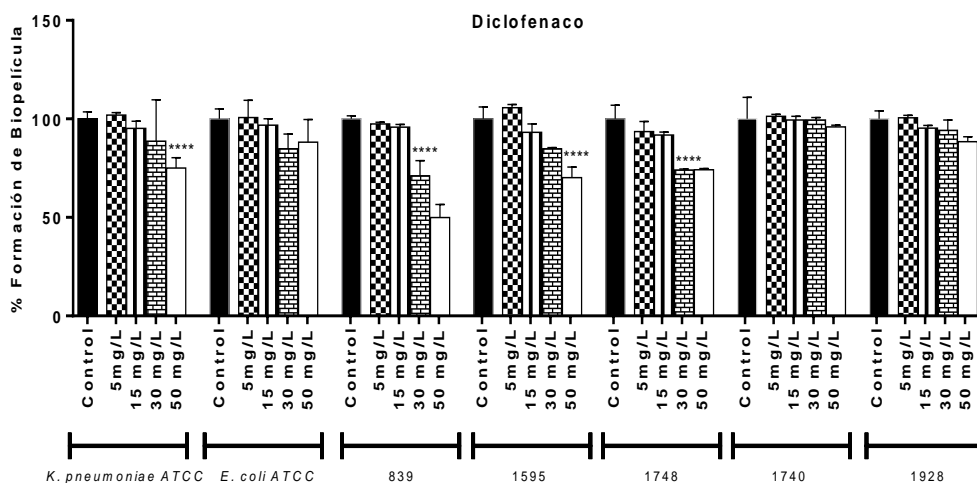


Figura 15. Efecto del diclofenaco sobre la formación de biopelículas en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* fuertes formadoras de biopelícula.

DIC redujo la formación de biopelícula significativamente en tres de las cinco aislados, de las cuales dos son *K.pneumoniae* y una es *E. coli*, con CMIB de 30 y 50 mg/L, observándose disminuciones del 26 – 30%. Incluso, para una muestra se encontró que la presencia de la concentración más alta (50 mg/L) provocó reducciones en la formación de biopelícula del 50.1%.

Reśliński *et al.*, 2013, reportaron que el diclofenaco e ibuprofeno a concentraciones iguales a las obtenidas de los fármacos en sangre humana (suero) inhibe la formación de biopelículas de *S. aureus* y *E. coli* en una superficie de malla de polipropileno [44].

Una cepa de *E. coli* (1740), no mostró cambios significativos en la formación de biopelículas con la exposición a IBU y DIC. Así como, todas de las cepas evaluadas cuando fueron tratadas con estos compuestos no presentaron un aumento significativo en la capacidad formadora de biopelícula con respecto al control.

Hasta el momento no se ha evaluado el efecto de IBU y DIC en la formación de biopelículas en cepas *K. pneumoniae*. Sin embargo si se han reportado estudios, donde se utilizan otros compuestos como derivados alcaloides, quitosano, ácido linoleico, curcumina y eugenol [77] y N-acetil cisteína, la cual se ha reportado que a una concentración de 2000 mg/L inhibe el crecimiento de una variedad de organismos Gram-positivos y negativos, incluyendo *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* [78].

5. CONCLUSIONES

- ✓ Este estudio mostró que las infecciones urinarias causadas en nuestra comunidad son generadas por *E. coli* prevalentemente y que hay otros microorganismos como *K. pneumoniae* que se encuentra en menor proporción. El 65% de las cepas aisladas presentaron un índice MAR mayor a 0.2, por lo que resultaron cepas con resistencia múltiple a los antibióticos utilizados en esta investigación. Algunas de las cepas aisladas se identificaron como productoras de betalactamasas de espectro extendido.
- ✓ De las 100 cepas estudiadas, 5 fueron fuertemente formadora de biopelícula y 49 moderada formadora de biopelícula. Estas cepas fueron las que presentaron resistencia múltiple a antibióticos, además, se estableció que las cepas fuertes formadoras de biopelículas presentaron niveles relativamente altos de actividad AHL. Por lo que la actividad formadora de biopelículas, quorum sensing y resistencia bacteriana tienen una relación estrecha en cepas uropatógenas.
- ✓ Se evidenció la producción de moléculas tipo acil homoserina lactonas (AHL) en cepas *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con ITU, esto puede deberse a la plasticidad genómica, responsable de la diversidad fenotípica y evolución de las cepas. Su genoma es altamente dinámico y por tanto las cepas patógenas asociadas a infecciones humanas son muy diversas. Muchos de los genes asociados a virulencia están agrupados dentro de inserciones en el cromosoma bacteriano denominadas islas de patogenicidad (PAI) o en plásmidos que son comúnmente encontrados en el genoma de las cepas patógenas, pero no en el genoma de cepas no patogénicas.

- ✓ La formación de biopelículas por cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* identificadas inicialmente como fuertes formadoras de biopelícula se redujo en un 50-60% cuando fueron tratados con ibuprofeno y diclofenaco a concentraciones sub-CMI.

6. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar estudios de susceptibilidad microbiana frente a antibióticos directamente sobre la biopelícula, para comparar la resistencia bacteriana con la presentada cuando las bacterias están en estado planctónico.

- ✓ Se deben continuar los estudios sobre otras moléculas señalizadoras que participan en el Quórum sensing en *E. coli* y *K. pneumoniae* para elucidar el mecanismo de comunicación bacteriana, evaluando como están interrelacionados y su impacto en el comportamiento bacteriano.

- ✓ Realizar estudios para elucidar el mecanismo por el cual Ibuprofeno y Diclofenaco son capaces de inhibir la formación de biopelículas en cepas uropatógenas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Asadi, S., et al., The Association of Virulence Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* With Antibiotic Resistance. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2014. **7**(5).
2. El-Mosalamy, H., et al., Role of chronic *E. coli* infection in the process of bladder cancer-an experimental study. *Infectious agents and cancer*, 2012. **7**(19): p. 1-7.
3. Kodner, C.M. and E.K. Thomas Gupton, Recurrent urinary tract infections in women: diagnosis and management. *American family physician*, 2010. **82**(6): p. 638.
4. Lee, J.B. and G.H. Neild, Urinary tract infection. *Medicine*, 2007. **35**(8): p. 423-428.
5. Pittet, D., et al., Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *Journal of Hospital Infection*, 2008. **68**(4): p. 285-292.
6. Root, R.K., *Clinical infectious diseases: a practical approach* 1999: Oxford University Press.
7. Murillo-Rojas, O.A., A.L. Leal-Castro, and J.H. Eslava-Schmalbach, Uso de antibióticos en infección de vías urinarias en una unidad de primer nivel de atención en salud, Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 2006. **8**: p. 170-181.
8. Karlowsky, J.A., et al., Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. **46**(8): p. 2540-2545.
9. Zalewska-Piątek, B., et al., Biochemical characteristic of biofilm of uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strains. *Microbiological research*, 2013. **168**(6): p. 367-378.
10. Mittal, S., M. Sharma, and U. Chaudhary, Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens and global health*, 2015. **109**(1): p. 26-29.
11. Anderson, G. and G. O'toole, Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms, in *Bacterial Biofilms* 2008, Springer. p. 85-105.
12. Viswanath, G., et al., Diversity and N-acyl-homoserine lactone production by Gammaproteobacteria associated with *Avicennia marina* rhizosphere of South Indian mangroves. *Systematic and applied microbiology*, 2015.
13. Picozzi, S.C., et al., Extended-spectrum beta-lactamase-positive *Escherichia coli* causing complicated upper urinary tract infection: Urologist should act in time. *Urology annals*, 2014. **6**(2): p. 107.
14. Gutiérrez-Soto, M., et al., Etiología microbiana y sensibilidad a los antibióticos de las infecciones urinarias en pacientes de la Unidad de Rehabilitación de un hospital regional. 2013.

15. Prakash, D. and R.S. Saxena, Distribution and antimicrobial susceptibility pattern of bacterial pathogens causing urinary tract infection in urban community of Meerut City, India. *ISRN microbiology*, 2013. **2013**.
16. Lezameta, L., E. Gonzáles-Escalante, and J.H. Tamariz, Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 2010. **27**(3): p. 345-351.
17. Stamm, W.E. and S.R. Norrby, Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *Journal of infectious diseases*, 2001. **183**(Supplement 1): p. S1-S4.
18. Cegelski, L., et al., The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*, 2008. **6**(1): p. 17-27.
19. Danese, P.N., Antibiofilm approaches: prevention of catheter colonization. *Chemistry & biology*, 2002. **9**(8): p. 873-880.
20. Lindsay, D. and A. Von Holy, Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 2006. **64**(4): p. 313-325.
21. Lim, K.B., et al., Escherichia coli α -hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated in vivo with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(47): p. 36698-36702.
22. Yardena, S.-I., et al., Reappraisal of community-acquired bacteremia: a proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. *Clinical infectious diseases*, 2002. **34**(11): p. 1431-1439.
23. Ingraham, J.L. and C.A. Ingraham, *Introducción a la microbiología*. II. Vol. 2. 1998: Reverté.
24. Ponnusamy, P. and R. Nagappan, Extended Spectrum Beta-Lactamase, Biofilm-producing Uropathogenic Pathogens and Their Antibiotic Susceptibility Patterns from Urinary Tract Infection-An Overview. *International Journal of Microbiological Research*, 2013. **4**(2): p. 101-118.
25. Sivick, K.E. and H.L. Mobley, Waging war against uropathogenic Escherichia coli: winning back the urinary tract. *Infection and immunity*, 2010. **78**(2): p. 568-585.
26. Tabibian, J.H., et al., Uropathogens and host characteristics. *Journal of clinical microbiology*, 2008. **46**(12): p. 3980-3986.
27. Sivick, K.E., et al., The innate immune response to uropathogenic Escherichia coli involves IL-17A in a murine model of urinary tract infection. *The journal of immunology*, 2010. **184**(4): p. 2065-2075.
28. Paterson, D.L. and R.A. Bonomo, Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 2005. **18**(4): p. 657-686.
29. Ambler, R., et al., A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochemical Journal*, 1991. **276**(Pt 1): p. 269.
30. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular

- structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995. **39**(6): p. 1211.
31. Müller, S., et al., Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and qnr plasmid-mediated quinolone resistance in German isolates of *Enterobacter* species. *Microbial Drug Resistance*, 2011. **17**(1): p. 99-103.
 32. Medeiros, A.A., Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical infectious diseases*, 1997. **24**(Supplement 1): p. S19-S45.
 33. Kumar, A. and R. Prasad, *Biofilms*. Science, 2006.
 34. Danhorn, T. and C. Fuqua, Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2007. **61**: p. 401-422.
 35. Greenberg, E.P., Bacterial communication and group behavior. *Journal of clinical investigation*, 2003. **112**(9): p. 1288.
 36. Zhu, H. and S. Sun, Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by *Tremella fuciformis* extract. *Current microbiology*, 2008. **57**(5): p. 418-422.
 37. Brango Vanegas, J.F., Búsqueda de compuestos inhibidores de Quorum Sensing (IQS) a partir de extractos de origen natural. Primera Fase, 2011, Universidad Nacional de Colombia.
 38. Barrios, A.F.G., et al., Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of bacteriology*, 2006. **188**(1): p. 305-316.
 39. Taghadosi, R., M.R. Shakibaie, and S. Masoumi, Biochemical detection of N-Acyl homoserine lactone from biofilm-forming uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection samples. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*. 2015. **3**(2):1-6
 40. Lewis, K., Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001. **45**(4): p. 999-1007.
 41. Davey, M.E. and G.A. O'toole, Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2000. **64**(4): p. 847-867.
 42. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 2000. **54**(1): p. 49-79.
 43. Pace, J.L., M.E. Rupp, and R.G. Finch, *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy* 2005: CRC Press.
 44. Reśliński, A., S. Dąbrowiecki, and K. Glowacka, The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh. *Hernia*, 2013. **19**(2): p. 179-185.
 45. Naves, P., et al., Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-L-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Hospital Infection*, 2010. **76**(2): p. 165-170.
 46. Bodor, Á.M., Quorum Sensing by the Bacterial Signal Autoinducer-2: Phylogenetic Distribution of the Synthesis Gene LuxS, and Its Role in *Shewanella Oneidensis*, 2008.

47. Cuadrado Silva, C.T., Aislamiento de n-acilhomoserinlactonas de algunas bacterias procedentes del mar Caribe colombiano, como evidencia de la existencia de circuitos de quorum sensing/Isolation of n-acyl homoserine lactones of bacteria recolected in caribbean colombian sea, as evidence of the existence of quorum sensing circuits, Universidad Nacional de Colombia.
48. FROM, A.R.O.B.I. and B.I.A.F.P. PLANT, Resistencia a antibioticos de bacterias aisladas de biopeliculas en una planta de alimentos. Revista MVZ Córdoba, 2009. **14**: p. 2.
49. Tay, S.B. and W.S. Yew, Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting Gram-negative bacterial pathogens. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(8): p. 16570-16599.
50. Zhou, X., X. Meng, and B. Sun, An EAL domain protein and cyclic AMP contribute to the interaction between the two quorum sensing systems in Escherichia coli. Cell research, 2008. **18**(9): p. 937-948.
51. Yin, W.-F., et al., N-acyl homoserine lactone production by Klebsiella pneumoniae isolated from human tongue surface. Sensors, 2012. **12**(3): p. 3472-3483.
52. Mehta, M., S. Bhardwaj, and J. Sharma, Screening of urinary isolates for the prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteria other than Escherichia coli. International Journal of Life Science and Pharma Research, 2013. **3**(1): p. 100-104.
53. Arce, Z., et al., Detección de genes shv y tem en cepas de Escherichia coli productoras de B-lactamasas de espectro extendido procedentes de dos centros hospitalarios de Chiclayo-Perú: enero-agosto 2011. Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo, 2012. **5**(3): p. 13-16.
54. Cockerill, F.R., Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement 2011: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
55. Hawser, S.P., et al., Susceptibility of Klebsiella pneumoniae Isolates from Intra-Abdominal Infections, and Molecular Characterization of Ertapenem-Resistant Isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011: p. AAC. 00070-11.
56. O'Toole, G.A. and R. Kolter, Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Molecular microbiology, 1998. **28**(3): p. 449-461.
57. Stepanović, S., I. Ćirković, and L. Ranin, Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. Letters in Applied Microbiology, 2004. **38**(5): p. 428-432.
58. Wang, J., et al., Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N-acyl homoserine lactones. Microbial biotechnology, 2011. **4**(4): p. 479-490.

59. Faleiro Naves, P.L., Formación de biopelículas por "Escherichia coli" y su correlación con factores de virulencia. 2009.
60. Akram, M., M. Shahid, and A.U. Khan, Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh, India. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 2007. **6**(1): p. 4.
61. Bano, K., et al., Patterns of antibiotic sensitivity of bacterial pathogens among urinary tract infections (UTI) patients in a Pakistani population. *Afr J Microbiol Res*, 2012. **6**(2): p. 414-20.
62. de Paz, A.R.A., A.R. Chávez, and N.R. Hernández, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas en pacientes con infección del tracto urinario. 2015.
63. Ibadene, H., et al., Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2008. **62**(1): p. 133-136.
64. Alós, J.I., et al., Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in relation to demographic and clinical data. *Clinical microbiology and infection*, 2005. **11**(3): p. 199-203.
65. Andreu, A., et al., Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 2005. **23**(1): p. 4-9.
66. Gómez, J.G., Infección urinaria por *Escherichia coli* multirresistente: impacto clínico y nuevas perspectivas. *Medicina clínica*, 2007. **129**(11): p. 412-413.
67. Merritt, K., V.M. Hitchins, and S.A. Brown, Safety and cleaning of medical materials and devices. *Journal of biomedical materials research*, 2000. **53**(2): p. 131-136.
68. Shikh-Bardsiri, H. and M.R. Shakibaie, *Proteus* Strains Isolated from Hospitalized Patients; Matter of Hospital Hygiene and Antimicrobial Stewardship. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2013. **16**(22): p. 1496-1502.
69. Hirales-Casillas, C.E., Bacterias multirresistentes formadoras de biopelículas en el área de terapia intensiva de un hospital de la ciudad de Chihuahua. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 2009
70. López, J.L.M. and G.V.N. Moorillón, biopelículas en la resistencia de bacterias aisladas. *Synthesis*. Octubre - Noviembre. 2008
71. Ahmer, B.M., Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*, 2004. **52**(4): p. 933-945.
72. Yang, Y.-H., et al., High-throughput detection method of quorum-sensing molecules by colorimetry and its applications. *Analytical biochemistry*, 2006. **356**(2): p. 297-299.

73. Drago, L., et al., Effects of subinhibitory concentrations of ibuprofen isobuthanolammonium on virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 2002. **14**(3): p. 314-315.
74. Douglas, L. and M. Alem, Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004. **48**(1): p. 41-47.
75. Diven, W.F., et al., Treatment of experimental acute otitis media with ibuprofen and ampicillin. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 1995. **33**(2): p. 127-139.
76. Konstan, M.W., K.M. Vargo, and P.B. Davis, Ibuprofen attenuates the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of chronic pulmonary infection. *Am Rev Respir Dis*, 1990. **141**: p. 186-192.
77. Magesh, H., et al., Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian journal of experimental biology*, 2013. **51**(9): p. 764-772.
78. Olofsson, A.-C., M. Hermansson, and H. Elwing, N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 2003. **69**(8): p. 4814-4822.