

RE M C B

REVISTA
ECUATORIANA DE
MEDICINA Y
CIENCIAS BIOLÓGICAS

e - I S S N 2 4 7 7 - 9 1 4 8

Vol. 42

Número 1
Mayo 2021



e-ISSN 2477 - 9148

REVISTA ECUATORIANA
DE MEDICINA Y
CIENCIAS BIOLÓGICAS

VOLUMEN XLII - Nº 1 - MAYO 2021

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen XLII Número 1 - Mayo - 2021
e-ISSN 2477 - 9148

Centro de Publicaciones de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Dir: Av. 12 de Octubre 1076 y Roca, Quito, Ecuador

Diseño y diagramación:



Diseño de portada: Belén Mena

Foto portada: Robbin Moran

Phelgmariurus reflexus (Lycopodiaceae) es una licofita común y muy difundida en los trópicos americanos. Se la puede distinguir fácilmente de otros géneros tropicales, por presentar tallos isodicotómicos (tallos que se dividen igualmente en dos partes). Presenta hojas sésiles, enteras y uninervadas. La foto representa a un espécimen encontrado al borde del carretero en la provincia de Imbabura, a 35 km al oeste de Otavalo.



**REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y
CIENCIAS BIOLÓGICAS
REMCB**

DIRECTORIO

Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Rector: Dr. Fernando Ponce León S.J.

Sociedad Ecuatoriana de Biología

Presidente: Lic. Ricardo Zambrano

Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión

Presidente: Sr. Camilo Restrepo Guzmán

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Doris Vela Peralta (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador)

Dr. Rommel Montúfar Galárraga (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador)

Dra. Catalina Quintana (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador)

Dra. Carmen Ulloa (Jardín Botánico de Missouri, USA)

Dra. Lorena Endara (Universidad de Florida USA)

CONSEJO CIENTÍFICO

Dr. Hugo Romero-Saltos (Universidad Yachay Tech, Ecuador)

Dr. Enrique Terán (Universidad San Francisco de Quito, Ecuador)

Dra. Paola Leone (Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador)

Dr. Thomas Couvreur (IRD, Francia)

La Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas (REMCB) es un órgano de difusión científica auspiciada por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), la Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión (CCE), y la Sociedad Ecuatoriana de Biología (SEB).

La REMCB publica trabajos originales fruto de la investigación científica y experimental en todas las áreas de la Medicina y las Ciencias Biológicas y está dirigida a los científicos nacionales e internacionales así como a estudiantes de las Ciencias de la Vida.

La REMCB se publica en formato electrónico en la web <http://remcb-puce.edu.ec/remcb/> y se encuentra incluida en el catálogo Latindex 2.0 (e-ISSN 2477-9148) y en las bases de REDIB y Dialnet. La REMCB mantiene un sistema de revisión por pares, su publicación es semestral, su contenido es de libre acceso y se distribuye bajo una licencia *CC-BY 4.0*. El contenido de los artículos científicos y de las publicaciones que aparecen en la revista son responsabilidad exclusiva de sus autores.

CONTENIDO

EDITORIAL	7
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS	9
Evaluación de la eficacia de cinco desinfectantes comerciales, aplicables en la cadena productiva de musáceas, contra cinco cepas de <i>Fusarium</i> spp.	11
Galo Andrés Ordoñez González, Alexander Javier Toaza Mora, Jennifer Marcela Yáñez Altuna, Elena Isabel Granda Moreno, Martín Sebastián Marcial-Coba	
El losartán disminuye la expresión del receptor para compuestos de glicosilación avanzada en el tejido cardiaco de ratas diabéticas	27
Nelson Muñóz, Jesús Mosquera, Adriana Pedreáñez	
Formación de biofilm en aislados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> de Quito y el Puyo	37
Andrés Sanguano, María Fernanda Yauri, Iliana Alcocer	
NOTAS CIENTÍFICAS	55
First record of <i>Phlegmariurus pruinosus</i> (Herter) B. Øllg. (Lycopodiaceae) for Ecuador from the Cordillera del Cóndor range	57
Álvaro J. Pérez, Nicolás Zapata, Daniela Cevallos, Claes Persson, Edison Rea, Benjamin Øllgaard	
Caracterización molecular de genes de resistencia a β-lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae	63
Duncan Coral, María Fernanda Yauri, Iliana Alcocer	

Ciencia y producción científica en el Ecuador en tiempos de la COVID-19

Ha transcurrido un poco más de un año desde que la Organización Mundial de la Salud declarara a la infección por el virus SARS-CoV-2 como una pandemia y por supuesto casi 18 meses desde que se reportaron los primeros casos de la COVID-19 en Wuhan, China. Difícilmente alguien, en pleno siglo XXI, podría haber pensado que un virus iba a cambiar por completo la hegemonía de vida que teníamos, que sería necesario el confinamiento parcial o total, que se suspenderían los viajes, el turismo e inclusive las actividades presenciales como clases, conferencias y demás. Este ha sido un periodo difícil para los investigadores, particularmente para los que hacen investigación experimental, pues sus proyectos han tenido que suspenderse, en muchos casos, o en otros “mutar” hacia temas relacionados a la COVID-19. Esa “covidización” de la investigación, como la denominó el doctor Madhukar Pai (Nat Med. 2020;26(8):1159) hizo que científicos bien intencionados con experticia real en un campo se entrometan en otro, emitiendo juicios cuando carecen de capacitación y conocimiento de nivel experto. Adicionalmente, en muchos países la pandemia motivó la asignación de recursos adicionales o especiales para fomentar la investigación en temas relacionados a la COVID-19, pero no fue el caso de Ecuador, en el que más bien se elaboraron normas y barreras para dificultar la investigación sobre la pandemia (Dev World Bioeth. 2021;21(1):3-6). Sin embargo, y frente a estas adversidades, parece que los científicos ecuatorianos encontraron la oportunidad de “desempolvar” sus datos guardados, ponerse al día con sus pendientes o simplemente maximizar sus colaboraciones, logrando que la producción reflejada en PubMed suba de 1136 registros en todo el 2019 a 1833 registros hasta el 30 de marzo del 2021 (+61%). Es interesante, además, resaltar que de acuerdo al Observatorio Iberoamericano de la Ciencia, Tecnología y la Sociedad (<http://octs.riicyt.org/reportes/explorador.html>) en el Ecuador solo hay 117 publicaciones relacionadas a COVID-19, a pesar de haber sido uno de los países más severamente afectados por esta pandemia.

No cabe duda que, esta pandemia ha sacado a relucir la crucial importancia que tiene la inversión en ciencia, tecnología e innovación, pero al mismo tiempo, ha evidenciado las falencias que tenemos desde el punto de vista estructural, legal y financiero. El Ecuador necesita instaurar cambios profundos, que permitan utilizar su talento humano para generar conocimiento y no solo para la docencia, rever ciertos criterios de evaluación basados solo en cantidad y no en calidad, pero por encima de todo eso, crear y respetar la asignación periódica, transparente y competitiva de fondos públicos para investigación.

Enrique Terán, MD, PhD
Profesor Principal
Universidad San Francisco de Quito

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Evaluación de la eficacia de cinco desinfectantes comerciales,
aplicables en la cadena productiva de musáceas, contra cinco
cepas de *Fusarium spp.*Evaluation of the efficacy of five commercial disinfectants, applicable in the
production chain of Musaceae, against five strains of *Fusarium spp.*Galo Andrés Ordoñez González¹, Alexander Javier Toaza Mora², Jenifer Marcela Yáñez
Altuna¹, Elena Isabel Granda Moreno¹, Martín Sebastián Marcial-Coba^{1*}¹ Pontificia Universidad Católica del
Ecuador (PUCE), Quito, Ecuador.² Laboratorio de Fitopatología de la
Agencia de Regulación y Control
Fito y Zoonosanitario – Ecuador
(Agrocalidad), Tumbaco, Ecuador.*Autor de correspondencia:
msmarcial@puce.edu.ecRecibido 30-09-2020
Aceptado 10-02-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i1.884

e-ISSN 2477-9148

© 2021. Este es un artículo
publicado en acceso abierto bajo
una licencia CC BY 4.0Como citar este artículo:
Ordoñez G, Toaza A, Yáñez J,
Granda E, Marcial-Coba M. 2021.
Evaluación de la eficacia de cinco
desinfectantes comerciales,
aplicables en la cadena productiva
de musáceas, contra cinco cepas de
Fusarium spp. Revista Ecuatoriana
de Medicina y Ciencias Biológicas
42(1): 11-25. doi: 10.26807/remcb.
v42i1.884

Resumen. - El cultivo de banano es uno de los más importantes a nivel mundial y el Ecuador es uno de los países con mayor capacidad de exportación. Esto representa elevados ingresos económicos para el país. Sin embargo, estos cultivos pueden ser afectados nuevamente por el Mal de Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Este trabajo está dirigido a determinar la efectividad de desinfectantes frente a cinco cepas distintas de *Fusarium spp.*, con el fin de contribuir a la implementación de procesos de bioseguridad en puntos de ingreso al país y en bananeras. Un total de 5 desinfectantes comerciales fueron seleccionados y su actividad fue evaluada luego de 30 segundos, 1 minuto y 5 minutos de exposición a una suspensión de macroconidios y otra de clamidosporas (10^6 /mL). De los desinfectantes probados, aquel compuesto por glutaraldehído y dos amonios cuaternarios fue el más eficiente al inhibir el desarrollo de *Fusarium spp.*, en la mayoría de las concentraciones evaluadas y en todos los tiempos de exposición. El producto a base de cloruro de alquil dimetil bencil amonio 20 % (amonio cuaternario) y aquel compuesto por ácido hipocloroso 0,05 % (neuthox) fueron efectivos generalmente en concentraciones mayores o iguales a la recomendada. Ninguno de los desinfectantes de dióxido de cloro fue eficaz inhibiendo el desarrollo de *Fusarium spp.*

Palabras clave: clamidosporas, concentración mínima inhibitoria, macroconidios, amonio cuaternario, glutaraldehído, ácido hipocloroso, dióxido de cloro.

Abstract. - Banana crop is one of the most important all over the world and Ecuador is one of the countries with the highest export ranges. This represents a significant economic income for the country. However, these crops could be affected by Panama Disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). This work aimed to determine the effect of disinfectants solutions against five strains of *Fusarium spp.*, (for the implementation of biosecurity procedures against this disease within farm, ports and airports). A total of 5 commercial disinfectants were screened and their activity was assessed through the exposure of a suspension containing 10^6 macroconidia or chlamydo spores /mL to different concentrations of the disinfectant agent after 30 seconds, 1 minute and 5 minutes, under laboratory conditions. Among the tested disinfectants, the formulation composed of glutaraldehyde and two different quaternary ammonium compounds was found to be the most effective against *Fusarium spp.* The product composed of 20 % quaternary ammonium along with the hypochlorous acid-based disinfectant were efficient only when high concentrations were applied, but not when fungal structures were exposed to lower concentrations of the formulation. None of the chlorine dioxide disinfectants was effective, in terms of inhibition of the fungal growth, under the evaluated parameters.

Keywords: chlamydo spores, minimal inhibitory concentration, macroconidia, quaternary ammonium, glutaraldehyde, hypochlorous acid, chlorine dioxide.

Introducción

El banano es una planta frutal herbácea perteneciente a la familia Musaceae (Al-daour et al. 2019). Las plantaciones de banano se desarrollan de forma óptima en regiones tropicales y subtropicales, con altitudes no mayores a 600 msnm y temperaturas aproximadas de 25 °C, lo que coincide con las condiciones agroclimáticas de regiones como Latinoamérica, Asia (principalmente India y Filipinas), y África occidental (Vásquez 2010; Soto 2011; Gonsabay 2014). Éste es uno de los cultivos de mayor producción a nivel mundial y Ecuador es uno de los países con mayor capacidad de exportación, alcanzando 6 685 000 toneladas en el año 2019 (FAO 2019). Consecuentemente, esto representa elevados ingresos económicos para el Ecuador como mayor productor mundial de esta fruta.

La existencia de determinados organismos fitopatógenos ha amenazado seriamente la viabilidad del cultivo de banano. Por ejemplo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 1 (Foc R1) es el agente etiológico de la enfermedad denominada “Mal de Panamá” que, durante las décadas del 50 y 60 del siglo anterior, devastó miles de hectáreas de banano de la variedad Gros Michel en el continente americano (Serrano 2012; Rodríguez et al. 2014; Pérez 2015). La sustitución de la variedad Gros Michel por tipos del subgrupo Cavendish, por su resistencia frente a Foc R1, constituyó la solución tomada en aquel entonces por todos los países afectados, incluyendo al Ecuador (Ploetz 2006; Pérez 2015). Asimismo, se ha documentado la existencia de la Raza 2 (Foc R2) que ataca a los bananos de cocción tipo Bluggoe, y la Raza 3 (Foc R3) que ataca a plantas ornamentales del grupo de las heliconias. Además de estas, la Raza 4 (Foc R4) afecta a todos los cultivares de Cavendish, conjuntamente con aquellas variedades sensibles a Foc R1 y Foc R2 (Dita et al. 2018). En función de la región geográfica en las que Foc R4 afecte a la variedad Cavendish, se reconocen dos divisiones del patógeno (Villaverde 2018). *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 división subtropical (Foc R4ST) es el causante de la enfermedad en zonas subtropicales cuando el cultivo se encuentra bajo condiciones de estrés, mientras que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 división tropical (Foc R4T) es patogénico en condiciones climáticas de regiones tropicales y subtropicales (Dita et al. 2018). Desde la aparición de Foc R4T en el Sudeste Asiático a inicios de los 90’s se ha constituido una seria amenaza para la industria bananera (Hwang y Ko 2004; Angel y Rodríguez 2016). En ese contexto, Foc R4T ha afectado seriamente a los cultivares de Cavendish en el Sur de Asia, Asia Pacífico, Sur de Australia, África y recientemente Colombia en América del Sur (ONU 2019), comprometiendo seriamente la supervivencia de los cultivos y consecuentemente conduciendo a grandes pérdidas económicas por parte de los principales exportadores de la fruta (Amani y Avagyan 2014). Ante la confirmación de la presencia de Foc R4T en cultivos de banano en Colombia en el mes de agosto de 2019, se incrementó la preocupación de los países vecinos con respecto a la potencial diseminación del patógeno en la región (ICA 2019; Miranda 2019). Hasta el mes de agosto del 2020 en La Guajira – Colombia, se reportaron aproximadamente 2 213 hectáreas, actualmente en cuarentena, afectadas por el hongo (ICA 2020).

A diferencia de otros organismos fitopatógenos que requieren de tejidos del hospedador para sobrevivir, las esporas de *Fusarium oxysporum* pueden ser transportadas, con gran facilidad, por medio de zapatos, equipos, equipajes, herramientas o cualquier utensilio que tenga contacto con el suelo contaminado con las esporas del hongo (Dita et al. 2010). Adicionalmente, las estructuras de este hongo pueden permanecer viables en el suelo por periodos prolongados de tiempo (Rodríguez et al. 2014; Dita y Martínez De La Parte 2014). Por ejemplo, las clamidosporas de Foc R4T sobreviven por más de 30 años, hasta encontrar las condiciones adecuadas para su germinación y desarrollo, lo que puede incluir el contacto con el hospedador (Ángel y Rodríguez 2016; Dita et al. 2013).

Dicho esto, la eventual entrada y diseminación de este patógeno al Ecuador tendría consecuencias devastadoras tanto económicas como en términos de seguridad alimentaria (Molina et al. 2009; Ángel y Rodríguez 2016). Una de las medidas más rápidas y simples para controlar la diseminación de Foc, es el uso de desinfectantes en implementos, equipos, zapatos, y otros objetos que puedan tener contacto con esporas fúngicas (Pérez y De la Parte 2015; Cedeño 2020). Estas formulaciones químicas se emplean con el propósito de inhibir el desarrollo de microorganismos sobre una superficie inerte u objeto inanimado, al ejercer su acción en distintas

estructuras de las células microbianas, limitando así la contaminación cruzada en múltiples cadenas de producción (Loor y Gordon 2013). La eficiencia de estos productos depende de la composición, la concentración, la temperatura y del tiempo de acción (Burguet et al. 2013). Esta también varía en función del organismo diana. Así por ejemplo, algunos hongos filamentosos son más resistentes a compuestos clorados, comparados con bacterias no esporuladas (Guentzel et al. 2010). La efectividad de un mismo desinfectante puede mostrar diferencias significativas, incluso, frente a distintas especies de hongos, siendo *Fusarium* spp. uno de los géneros más resistentes (Rood et al. 2018; Guerra et al. 2019). El pH es otro valor para tener en cuenta, ya que las formas ionizadas de los agentes disociables son más efectivas al permear con mayor facilidad a través de las membranas biológicas (los agentes aniónicos tienen mayor actividad a pH ácido y los catiónicos a pH alcalino) (Meldrum et al. 2013).

Previamente se han realizado estudios relacionados a la eficiencia de desinfectantes comerciales frente a diferentes cepas de *F. oxysporum* en distintas plantaciones. Estas investigaciones han evidenciado resultados variables. Por ejemplo, mientras productos a base de detergentes (ácido alquilbencenosulfónico, dietanolamida de coco, piridina-2-14 tiol 1-óxido y sal de sodio), como Castrol Farmcleanse (Castrol Australia Pty Ltd., Docklands, VIC, Australia), han mostrado eficiencia en el control del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* en plantaciones de algodón (Moore et al. 2001; Bennett et al. 2011), otros ensayos más recientes han demostrado que no son efectivos previniendo la germinación y el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 subtropical (Nel et al. 2007; Pérez 2015). En contraste, los productos a base de amonio cuaternario presentan mayor eficiencia inhibiendo el desarrollo de varias cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 y raza 4, divisiones subtropical y tropical, en diferentes condiciones de ensayo (Nel et al. 2007; Meldrum et al. 2013). Se conoce también que el agua neutral electrolizada (NEW por sus siglas en inglés), cuyo ingrediente activo es ácido hipocloroso, es efectivo reduciendo el número de conidios de *Fusarium* spp. en semillas y frutas de tomate infectadas artificialmente (Vásquez et al. 2016; Guerra et al. 2019). Asimismo, la eficacia de formulaciones a base de dióxido de cloro frente a conidios y clamidosporas de *Fusarium oxysporum* también ha sido evaluada, observándose resultados variables (Copes et al. 2004; Scarlett et al. 2016).

En función de la mencionada variabilidad de resultados, se considera necesario evaluar diversos desinfectantes disponibles en el mercado local, con el propósito de seleccionar productos capaces de inhibir el desarrollo de cepas de *Fusarium* spp. y así obtener resultados orientados a la delimitación de fungicidas que podrían evaluarse y aplicarse como medidas de prevención en plantaciones y puntos de ingreso al país, como puertos y aeropuertos frente al potencial ingreso de Foc R4T al Ecuador.

Considerando la amenaza fitosanitaria que Foc R4T representa para los cultivos de banano en el Ecuador, el principal propósito de esta investigación fue evaluar la eficacia de varios desinfectantes comerciales, en función de la concentración y el tiempo de contacto, frente a un amplio espectro de cepas de *Fusarium* spp., en conexión con la estrategia de prevención ante la eventual entrada de éste patógeno al país. Este artículo podría constituir una herramienta capaz de aportar información confiable para el establecimiento de medidas preventivas frente a Foc R4T en la cadena productiva de musáceas y en distintos puntos de ingreso al país, como puertos y aeropuertos.

Materiales Y Métodos

Selección de cepas fúngicas y desinfectantes. - Las cepas seleccionadas para el presente estudio fueron provenientes de las colecciones de cultivos pertenecientes a los laboratorios de Fitopatología de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (Agrocalidad) y de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Se utilizaron 5 cepas de *Fusarium* spp., previamente aisladas y rigurosamente identificadas (Tabla 1).

Se utilizaron 5 desinfectantes comerciales con diferentes composiciones químicas (Tabla 2). De cada uno de los desinfectantes se consideraron seis diferentes concentraciones especificadas

Tabla 1. Cepas empleadas en el estudio

Código	Especie	Regiones secuenciadas para identificación del organismo	Cultivo de origen
FP 19-0958	<i>F. oxysporum</i>	ITS y TEF	Banano
B-MB-01	<i>F. oxysporum</i>	ITS y TEF	Banano
FP 15-0317	<i>F. oxysporum</i>	ITS y TEF	Frutilla
FP 14-062	<i>F. incarnatum - equiseti</i>	ITS y TEF	Soya
YC3	<i>F. oxysporum</i>	ITS y TEF	Uvilla

Cepas de *Fusarium* spp. empleadas en los ensayos de eficacia de desinfectantes. *F. oxysporum* YC3 provino de la colección de cultivos del laboratorio de Fitopatología de la PUCE, mientras que *F. oxysporum* FP 19-0958, B-MB-01 y FP 15-0317 junto con *F. incarnatum – equiseti* FP 14-062 pertenecen a la colección de cultivos del laboratorio de Fitopatología de Agrocalidad

en la (Tabla 2).

Suspensión de macroconidios y clamidosporas. - A partir de criviales conservados a -80 °C, cada una de las cepas fue propagada, de forma individual, en 5 cajas Petri conteniendo PDA (Potato Dextrosa Agar). Para esto, los cultivos fueron incubados a 25 °C durante 10 días. La pureza de cada cepa en el medio de cultivo se determinó mediante análisis microscópico. La suspensión de macroconidios de cada cepa se preparó removiendo el micelio de la superficie de los cultivos utilizando un asa micológica. Éste se transfirió a un matraz Erlenmeyer estéril conteniendo 50 mL de solución fisiológica de NaCl 0.85 % con perlas de vidrio de 3 mm de diámetro. Esta preparación se homogenizó en un agitador rotatorio durante 30 minutos y luego se filtró el contenido a través de almohadillas de algodón estériles para remover las hifas del patógeno. La concentración fue ajustada a 10⁶ macroconidios/mL, lo que fue confirmado mediante recuento en cámara de Neubauer (AOAC 2005; Davicino et al. 2007; Lin et al. 2016). En cuanto a la suspensión de clamidosporas se siguió la metodología descrita por (Nguyen et al. 2019) con algunas modificaciones. Brevemente, las cepas se propagaron en 5 cajas Petri con medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) bajo las mismas condiciones descritas arriba. A partir de los cultivos en SNA se transfirió el micelio superficial directamente a frascos con 50 mL de caldo suelo estéril. Estos se agitaron a 90 rpm en un agitador orbital a temperatura ambiente por 10 días. Se realizaron recuentos en cámara de Neubauer, periódicamente, desde el quinto día hasta llegar a la concentración de 10⁶ clamidosporas/mL. Finalmente, este cultivo líquido se filtró haciendo uso de almohadillas de algodón estériles, con el fin de capturar clamidosporas, y posteriormente se filtró el algodón empleado anteriormente, en sentido inverso, para depositar los propágulos de clamidosporas en 50 mL de solución estéril de NaCl 0,85 %.

Ensayo de contacto. - Se empleó la metodología 955. 17 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC 2005). Para ello, se prepararon 5 ml de las diluciones de los desinfectantes (Tabla 2). Conjuntamente se utilizó un control negativo de fenol que permite el crecimiento fúngico a una dilución de 1:70 y un control positivo de fenol que inhibe el desarrollo del hongo a una dilución de 1:60. Los tubos con las distintas diluciones de los desinfectantes fueron temperados en baño María a 25 °C. Luego se colocó, de forma individual, 0,5 mL de la solución stock de macroconidios o clamidosporas en los tubos con las distintas concentraciones de desinfectantes. Transcurrido el tiempo de exposición (30 segundos, 1 y 5 minutos) se inocularon 10 µL de la suspensión anterior, en 10 mL de caldo glucosa suplementado con lecitina 0,07 % y 0,5 % de polisorbato 80, como agentes neutralizantes de la acción fungistática de los desinfectantes (Fernández-Crehuet et al. 2013). Este procedimiento, en cuanto a los controles, se realizó a un tiempo de exposición de 10 minutos. Los tubos con caldo glucosa modificado se incubaron a 25 °C por 10 días. A partir de ese momento, se observaron los resultados finales mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada producto desinfectante, en función de la turbidez del medio de cultivo.

Tabla 2. Composición de los desinfectantes y concentraciones de cada producto evaluados en el estudio

Desinfectante	Composición					Casa Comercial
Agri'germ 1510	Glutaraldehído 15 %					Imvab CIA.LTDA
	Cloruro de Alquil Dimetil Bencil Amonio 8 %					
	Cloruro de Dimetil Didecil Amonio 2 %					
Amonio cuaternario	Cloruro de Alquil Dimetil Bencil Amonio 20 %					Maymo S.A.
Neuthox	Ácido hipocloroso 0,05 %					Danish Clean Water S.A.
Clodos Puro	Dióxido de cloro 0,0075 % (75 ppm)					STC S.L.U.
Biocidox	Dióxido de cloro 10 % (Tabletas 20 g)					Boeckorp S.A.
Diluciones (%)						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Agri'germ 1510	1,6	1,2	0,8	0,4	0,2	0,1
Amonio cuaternario	0,2	0,15	0,1	0,05	0,025	0,0125
Neuthox	60	45	30	15	7,5	3,75
Clodos Puro	0,58	0,43	0,29	0,15	0,075	0,038
Biocidox	0,002	0,0015	0,001	0,0005	0,00025	0,00013

Valores numéricos corresponden a la concentración del producto en las diluciones consideradas para el ensayo: C1 - doble de la concentración recomendada; C2 - promedio de la concentración recomendada y del doble de esta; C3 - concentración recomendada por el fabricante; C4 - dilución 1:2 de la concentración recomendada; C5 - dilución 1:4 de la concentración recomendada; C6 - dilución 1:8 de la concentración recomendada.

Como método de confirmación se empleó el método de siembra de mohos y levaduras de la Norma ISO 21527-2 (2018) con algunas modificaciones. De forma aleatoria entre las réplicas (por cepa y por desinfectante), se seleccionó uno de los tubos con la concentración más baja de aquellos que presentaron inhibición y se inoculó 100 µL de su contenido sobre la superficie en agar PDA, esperando crecimiento nulo de microorganismos después de 10 días de incubación a 25 °C. Por otra parte, se seleccionó de forma aleatoria, uno de los tubos que presentaron crecimiento con la concentración más alta del desinfectante y se inocularon 100 µL de su contenido en agar PDA, con el propósito de evidenciar el desarrollo, únicamente, de *Fusarium* spp., luego del tiempo de incubación (bajo las condiciones previamente descritas), y así descartar la presencia de microorganismos contaminantes que pudieran interferir en los resultados del ensayo.

Análisis estadístico. -Todos los ensayos experimentales fueron ejecutados por duplicado siguiendo la norma de la AOAC (2005). Para determinar el nivel de significación entre los desinfectantes con la inhibición de *Fusarium* spp. y predecir la relación de las variables, los resultados se analizaron mediante regresión logística binaria conjuntamente para macroconidios y clamidosporas. Los datos se agruparon en dos grupos: variables independientes (tipo de desinfectante, concentraciones de cada uno y el tiempo de exposición) y variables dependientes (inhibición o desarrollo del hongo). Para ello se hizo uso del software IBM Statistical Package for the Social Science - SPSS 22 (IBM Corporation 2015; Li et al. 2015).

Resultados

La efectividad de los desinfectantes frente a *Fusarium* spp. fue medida en base a la concentración mínima inhibitoria (CMI), es decir, la dilución más alta capaz de inhibir el desarrollo de macroconidios y clamidosporas dentro de cada tiempo de exposición. A los 30 segundos de exposición, únicamente Agri'germ 1510 inhibió el crecimiento de macroconidios de todas

las cepas en la dosis recomendada (producto diluido al 0,8 % equivalente a glutaraldehído 0,12 %, cloruro de alquil dimetil bencil amonio 0,064 %, cloruro de dimetil didecil amonio 0,016 %). Además, la CMI de este producto osciló entre C6 (0,1 %) y C3 (concentración recomendada). En el caso de clamidosporas, la CMI de Agri'germ 1510 frente a cada cepa aumentó a la concentración inmediata superior para todas las cepas evaluadas (Tabla 3). Neuthox inhibió el crecimiento de macroconidios de las cepas FP 19-0958 y FP 15-0317 en la concentración recomendada (C3 – producto diluido al 30 % equivalente a ácido hipocloroso 0.015 %), y en las cepas restantes en la dilución C2 (producto diluido al 45 %). Respecto al ensayo con clamidosporas de *Fusarium* spp., se requirieron las concentraciones C1 (producto diluido al 60 %) y C2 (producto diluido al 45 %) para inhibir el desarrollo de las estructuras fúngicas. La CMI del producto Amonio cuaternario frente a macroconidios, en este tiempo de exposición, fue C1 (producto diluido al 0,2 %) para todas las cepas, con excepción de FP 19-0958 y B-MB-01. En contraste, frente a clamidosporas este desinfectante impidió el crecimiento de todas las cepas en la misma dilución (C1), exceptuando el aislamiento B-MB-01. Los desinfectantes Clodos Puro y Biocidox no inhibieron la germinación de macroconidios y clamidosporas de las cepas de *Fusarium* spp. evaluadas, en ninguna concentración y tiempo de exposición (Tabla 3).

Transcurrido un minuto de exposición, la CMI de Agri'germ 1510 frente a macroconidios fue inferior en dos cepas, reduciéndose de C4 (producto diluido al 0,4 %) a C5 (producto diluido al 0,2 %). Este desinfectante fue el único en inhibir el crecimiento de clamidosporas, de cada una de las cepas empleadas, dentro de la concentración recomendada al minuto de contacto. Sin

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de cada desinfectante inhibiendo el crecimiento de conidios y clamidosporas de 5 cepas de *Fusarium* spp. a los 30 segundos, 1 minuto y 5 minutos de exposición

Cepas	Concentración Mínima Inhibitoria									
	Conidios					Clamidosporas				
	Agri'germ 1510	Neuthox	Amonio cuaternario	Clodos Puro	Biocidox	Agri'germ 1510	Neuthox	Amonio cuaternario	Clodos Puro	Biocidox
30 segundos										
FP19-0958	C3	C3	NI	NI	NI	C2	C2	C1	NI	NI
B-MB-01	C6	C2	NI	NI	NI	C5	C2	NI	NI	NI
FP15-0317	C5	C3	C1	NI	NI	C4	C1	C1	NI	NI
FP 14-062	C4	C2	C1	NI	NI	C3	C1	C1	NI	NI
YC3	C4	C2	C1	NI	NI	C3	C2	C1	NI	NI
1 minuto										
FP19-0958	C3	C3	C3	NI	NI	C3	C2	C1	NI	NI
B-MB-01	C6	C3	C1	NI	NI	C6	C2	C1	NI	NI
FP15-0317	C5	C3	C2	NI	NI	C5	C3	C3	NI	NI
FP 14-062	C5	C3	C2	NI	NI	C5	C2	C1	NI	NI
YC3	C5	C4	C1	NI	NI	C5	C3	C1	NI	NI
5 minutos										
FP19-0958	C4	C4	C3	NI	NI	C4	C3	C3	NI	NI
B-MB-01	C6	C3	C1	NI	NI	C6	C4	C1	NI	NI
FP15-0317	C5	C4	C3	NI	NI	C5	C3	C3	NI	NI
FP 14-062	C5	C3	C3	NI	NI	C5	C3	C3	NI	NI
YC3	C5	C4	C4	NI	NI	C5	C3	C3	NI	NI

[C1] doble de la concentración recomendada, [C2] promedio de la concentración recomendada y del doble de esta, [C3] Concentración recomendada por el fabricante, [C4] Dilución 1:2 de la concentración recomendada, [C5] Dilución 1:4 de la concentración recomendada, [C6] Dilución 1:8 de la concentración recomendada, [NI] No hay inhibición de conidios y/o clamidosporas

embargo, no existió diferencia con relación al ensayo efectuado con macroconidios durante el mismo tiempo de exposición. En el caso de Neuthox, la concentración recomendada (C3 – producto diluido al 30 %) correspondió a la CMI para macroconidios de todas las cepas, menos para la cepa YC3, cuya CMI correspondió a la dilución C4 (producto diluido al 15 %). La CMI de este producto para clamidosporas osciló entre C2 (producto diluido al 45 %) y C3 (producto diluido al 30 %), siendo mayor en todos los casos a la concentración requerida para inhibir macroconidios. El producto Amonio cuaternario tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de macroconidios y clamidosporas de todas las cepas en las tres primeras concentraciones. No obstante, la concentración más elevada (C1 equivalente a una dilución del 0,2 % del producto) fue necesaria para evitar la propagación de clamidosporas, exceptuando la cepa FP 15-0317 cuya CMI (C3 – 30 %) fue menor en comparación con C2 (producto diluido al 45 %) que inhibió los macroconidios de esta cepa (Tabla 3).

Al cabo de 5 minutos de exposición, Agri'germ 1510 mostró un efecto fungistático, sobre las diferentes cepas evaluadas, en las diluciones C4 (0,4 %), C5 (0,2 %) y C6 (0,1 %). La CMI de Agri'germ 1510 frente a macroconidios y clamidosporas no varió con relación al minuto de exposición, con excepción de la cepa FP19-0958, para la cual la CMI disminuyó de C3 (producto diluido al 0,8 %) a C4 (producto diluido al 0,4 %). La CMI de Neuthox ante la presencia de macroconidios fue inferior para dos cepas (FP19-0958 y FP15-0317), pasando de C3 (30 %), luego de 1 minuto de exposición, a C4 (15 %) tras 5 minutos de exposición. Con respecto al ensayo ejecutado con clamidosporas expuestas a Neuthox, la CMI también decreció con respecto al anterior tiempo de exposición. Vale resaltar el caso de la cepa B-MB-01, para la cual se evidenció que la CMI frente a clamidosporas fue menor que aquella registrada en macroconidios después de exponerse por 5 minutos al desinfectante Neuthox. El producto Amonio cuaternario inhibió a los macroconidios del hongo desde la dilución C4 (0,05 %) hasta C1 (0,2 %), observándose una disminución en la CMI para dos cepas (FP 19-0958 y FP 15-0317). Asimismo, la CMI frente a clamidosporas luego de 5 minutos de exposición al producto amonio cuaternario fue C3 (producto diluido al 0,1 % equivalente a cloruro de alquil dimetil bencil amonio 0.02 %), excepto la cepa B-MB-01. Igualmente, es necesario mencionar que la CMI frente a ambas estructuras fúngicas no varía dentro de los 5 minutos, excluyendo a la cepa YC3 (Tabla 3).

En base al análisis estadístico realizado en conjunto para conidios y clamidosporas, queda demostrado que el desinfectante con la probabilidad más alta de inhibir el crecimiento de *Fusarium* spp. es Agri'germ 1510 (Exp-B = 0,12: $P = 0,000$). Asimismo, el aumento del tiempo de exposición está relacionado directamente con una mayor efectividad del desinfectante (Exp-B = 2,650: $P = 0,000$). Finalmente, se demostró que el factor de dilución de los productos se relaciona de forma inversa con su efecto desinfectante (Exp-B = 0,250: $P = 0,000$). Las variables independientes (tipo de desinfectante, concentración y tiempo de exposición) se relacionaron directamente con las variables dependientes (desarrollo o inhibición del hongo). Esto se justificó con el análisis de regresión logística, mostrando que existe un 88,1 % de probabilidad de acierto en los resultados obtenidos de las variables dependientes (Tabla 4).

A partir de este resultado, se tomó en cuenta la significancia del modelo ($< 0,05$) y el valor de la ecuación de la regresión (Exp-B): si este es > 1 , quiere decir que al aumentar el número de la variable independiente la inhibición del microorganismo se vuelve más probable; si el valor es < 1 , indica que al aumentar el número de la variable independiente la inhibición del microorganismo es menos probable (Tabla 4).

Discusión

En la evaluación de la eficacia de distintos desinfectantes comerciales en relación al desarrollo de propágulos de varias cepas de *Fusarium* spp. se emplearon dos desinfectantes con compuestos de amonio cuaternario, siendo Agri'germ 1510 el más eficiente. Probablemente, la complejidad de su formulación y concentración de cada uno de sus ingredientes activos (glutaraldehído 15 %, cloruro de alquil dimetil bencil amonio 8 %, cloruro de dimetil didecil amonio 2 %) resultó en una mayor efectividad contra macroconidios y clamidosporas de las cepas de *Fusarium* spp., utilizadas en esta investigación, en función de los parámetros evaluados. Éste fenómeno podría explicarse, en primer lugar, por el efecto del glutaraldehído que radica en la destrucción de los

Tabla 4.- Regresión logística – probabilidad y valores de la ecuación de regresión logística

Tabla de clasificación					
SCIC Observado	SCIC Pronosticado		Corrección de porcentaje	Sig.	Ecuación de la regresión logística (Exp-B)
	Con crecimiento	Sin crecimiento			
Con crecimiento	582	49	92,2		
Sin crecimiento	58	211	78,4		
Porcentaje global			88,1		
	Valores del coeficiente B	Error estándar	Grados de libertad (gl)		
Dilución	-1,38	0,11	1	0	0,25
Tiempo exposición	0,98	0,16	1	0	2,65
Desinfectante	-2,14	0,16	1	0	0,12
Constante	6,9	0,65	1	0	994,22

componentes celulares, alterando la síntesis proteica de bacterias, micobacterias, virus y hongos (Cowan et al. 1993; Alvares 2018). En conexión con esto, se ha observado que glutaraldehído en una concentración de 0,25 % tiene un efecto esporicida del 100 % frente a *F. oxysporum* f. sp. *narcissi* (Linfield 1991). Adicionalmente, los compuestos de amonio cuaternario, en este caso cloruro de alquil dimetil bencil amonio y cloruro de dimetil didecil amonio, al ser tensoactivos reducen la tensión superficial, lo que facilita la adsorción a las superficies y causan la ruptura de las membranas celulares de los microorganismos expuestos (Nogueira 2013; Zubel 2020). En sinergia, los compuestos de amonio cuaternario y los del grupo de los aldehídos han demostrado ser idóneos al disminuir los niveles de contaminación microbiana en superficies y utensilios dentro de laboratorios clínicos (Finch y Fay 1994; Takahashi y Fava 2011; Christen et al. 2017). Igualmente, el efecto de la combinación de estos compuestos químicos es capaz de reducir el desarrollo de resistencia, en aquellos microorganismos que pueden generar mecanismos para contrarrestar el efecto desinfectante de los aldehídos y en aquellos que puedan formar biofilms en superficies u otros objetos (Kilvington et al. 2013; Ocampo et al. 2019). Estos mecanismos de resistencia adquirida pueden ser el resultado de mutaciones de genes cromosómicos o por la adquisición de material genético en la forma de transposones (Vijayakumar y Sandle 2018).

Estudios previos realizados en Australia determinaron que los productos compuestos a base de amonio cuaternario (Banana Basher Cleaner, Banana Shed/Equipment Cleaner, Organic Food Fungal Cleaner, Sporekill, entre otros) son significativamente más efectivos inhibiendo el crecimiento de propágulos de clamidosporas de Foc R1 y Foc R4T, en condiciones similares a nuestro estudio, en todos los tiempos de exposición evaluados (30 segundos, 5 minutos, 30 minutos y 24 horas) y todas las diluciones empleadas (1:10, 1:100 y con menor impacto en 1:1000) (Nel et al. 2007; Meldrum et al. 2013; Nguyen et al. 2019). Los resultados en cuanto al segundo producto de Amonio cuaternario (cloruro de alquil dimetil bencil amonio 20 %) evaluado en este estudio son consistentes con ensayos anteriores, debido a que se evidencia la efectividad del producto al emplear diluciones \geq 1:1000 o 0,1 % dependiendo de la cepa. Igualmente, esto sugiere que la concentración de ingrediente activo es una variable a tomar en cuenta. En relación con eso, previamente se ha observado que aquellos productos, con concentraciones \geq 10 % de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio, cloruro de didecil dimetil amonio, cloruro de alquil bencil dimetil amonio), con un tiempo de exposición comprendido entre 30 segundos y 24 horas presentan mayor efectividad frente a Foc (Nguyen et al. 2019). Además, es importante destacar que los resultados con este desinfectante variaron dependiendo de la cepa. Por ejemplo, la cepa B-MB-01 presentó una CMI general de 0,2 % y en el resto de las cepas se evidenció una CMI que osciló entre 0,15 % y 0,1 % en macroconidios y clamidosporas (Tabla 3). Esto sugiere que la concentración a ser aplicada debería ser aquella que demuestre eficiencia frente al más amplio espectro de cepas de *Fusarium* spp. Además, se pudo determinar que la CMI de todos

los desinfectantes, sobre las dos estructuras fúngicas evaluadas varió en función del tiempo de exposición (principalmente a los 30 segundos), resultando en una mayor resistencia por parte de las clamidosporas en función de la estructura de su pared y la presencia de biomoléculas de reserva (Warman y Aitken 2018).

En lo referente a Neuthox, este producto resultó ser el segundo desinfectante más eficiente en los 30 segundos de exposición en las concentraciones C2 (45 %) frente a macroconidios de las cepas B-MB-01, FP 14-062 y YC3, y C3 (30 %) en los aislamientos restantes (Tabla 3). Mientras que, frente a clamidosporas fueron C1 (60 %) en las cepas FP 15-0317 y FP 14-062, y C2 (45 %) en el resto de cepas (Tabla 3). Sin embargo, presenta mayor efectividad en todas las cepas dentro de la dilución recomendada (30 % - C3) a partir del minuto de exposición frente a macroconidios y desde los 5 minutos de exposición frente a clamidosporas. Este desinfectante está compuesto por ácido hipocloroso (HClO), el cual forma parte de un nuevo conjunto de sustancias microbidas que por su amplio espectro, rápida acción, amplio margen de seguridad, concentración y forma de estabilización, puede ser utilizado en procesos de desinfección y/o para controlar y prevenir un amplio número de infecciones en piel y mucosas (Calderón 2010). Los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental con el producto Neuthox son consistentes con los hallazgos concluyentes de ensayos previos. En ese contexto, ciertos estudios demuestran que el HClO es capaz de reducir en $\geq 99,99\%$ el número de macroconidios viables de *Fusarium solani*, en condiciones de laboratorio, a una concentración de 0,01 % a partir del minuto de exposición y a concentraciones de 0,004 a 0,006 % a partir de los 10 minutos de exposición (Robson et al. 2007; Audenaert et al. 2012; Odorcic et al. 2015; Guerra et al. 2019). Las concentraciones de ácido hipocloroso que inhibieron el desarrollo de *Fusarium* spp. en el presente estudio son: 0,03 %; 0,023 %; 0,015 % y 0,008 %. De forma general, los compuestos de cloro son poderosos germicidas de amplio espectro de actividad, reactivos con la materia orgánica y deben usarse sobre superficies limpias o en concentraciones elevadas para garantizar un proceso de desinfección eficiente (Torres y Araujo 2008). El cloro y sus derivados ejercen su efecto inhibiendo reacciones enzimáticas, desnaturaliza proteínas e inactiva ácidos nucleicos (Medina y Valencia 2008; Flamenco y Guevara 2011)

En esta investigación, los productos a base de dióxido de cloro (Clodos Puro y Biocidox) no inhibieron el crecimiento de ninguna de las cepas de *Fusarium* spp. en ninguna de las concentraciones y tiempos de exposición evaluados. Sin embargo, otros estudios han determinado que las concentraciones óptimas de dióxido de cloro, diluido en agua destilada, son: 1 ppm (0,0001 %), 3 ppm (0,0003 %) y 5 ppm (0,0005 %) durante 4 minutos frente a macroconidios, micelio y clamidosporas de *Fusarium* spp. respectivamente (Copes et al. 2004; Scarlett et al. 2016). Asimismo, cabe añadir que ensayos *in vitro* llevados a cabo con dióxido de cloro gaseoso demostraron que la aplicación de este compuesto es capaz de inhibir significativamente, en concentraciones superiores a 0,0001 %, el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*, durante un tiempo de exposición de 30 minutos (Lee et al. 2019). Mientras que, en este estudio se trabajó con Clodos Puro con un rango de 0,000028 (C6 – producto diluido al 0,038 %) a 0,000044 % (C1 – producto diluido al 0,58 %) de dióxido de cloro, concentraciones considerablemente inferiores con relación a estudios previos. Además, no se observó inhibición del crecimiento de macroconidios y clamidosporas de ninguna de las cepas de *Fusarium* spp. con el producto Biocidox, en concentraciones de 1 ppm, 1,5 ppm y 2 ppm de dióxido de cloro, mostrando diferencias con el estudio publicado por Scarlett et al. (2016). Adicionalmente, en el estudio llevado a cabo con dióxido de cloro gaseoso (Lee et al. 2019), la concentración y el tiempo de exposición para impedir el desarrollo del hongo son más altos que los evaluados en el presente estudio en el que se utilizó dióxido de cloro en solución. En cuanto a Clodos Puro y Biocidox es necesario evaluar concentraciones superiores a 2 ppm (0,0002 %) durante los mismos tiempos de exposición, con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria. Estudios realizados en Australia demostraron que un aumento en el tiempo de contacto a 24 horas mejoró la eficacia de la mayoría de los desinfectantes contra Foc R1 y R4T en comparación con los tiempos de contacto más cortos (Nguyen et al. 2019).

Nuestros resultados fueron respaldados mediante el uso de controles de fenol (control positivo: dilución 1:60 y control negativo: dilución 1:70), compuesto que se emplea como desinfectante a

altas concentraciones debido a su capacidad de desnaturalizar proteínas y romper las membranas celulares (Kahrs 2008; Robles et al. 2018). Además, a partir de los tubos seleccionados entre los controles positivos y aquellos que presentaban crecimiento fúngico, se comprobó la presencia únicamente de *Fusarium* spp. mediante observación macroscópica y microscópica, luego de ser sembrados en superficie en agar PDA, basándose en la metodología ISO 21527-2 (2018).

Es necesario realizar estudios posteriores tomando en cuenta condiciones ambientales más realistas. Por ejemplo la materia orgánica puede interferir en la efectividad del desinfectante al neutralizarlo (Bennett et al. 2011; Meldrum et al. 2013; Nguyen et al. 2019), principalmente por su efecto quelante (Tezel y Pavlostathis 2015). Adicionalmente, el tiempo de contacto junto a otros factores, como la temperatura del agua, el pH y el contenido mineral, afectan las propiedades germicidas de los desinfectantes, (Copes et al. 2004; Berrang et al. 2011; Scarlett et al. 2016). Estos factores no fueron considerados en esta investigación, pero podrían afectar la actividad del desinfectante. Además de la eficacia del producto, se debe considerar su coste, la corrosividad, la longevidad y el impacto ambiental.

Conclusión

Este ensayo ha evaluado la eficacia de varios desinfectantes comerciales frente a macroconidios y clamidosporas de cinco cepas de *Fusarium* spp. Se determinó que Agri'germ 1510, compuesto por glutaraldehído 15 % y dos tipos de amonio cuaternario (cloruro de alquil dimetil bencil amonio 8 % y cloruro de dimetil didecil amonio 2 %), fue el desinfectante más efectivo inhibiendo a todas las cepas de *Fusarium* spp. en todos los tiempos de exposición con la concentración recomendada y las diluciones menos concentradas. Neuthox (ácido hipocloroso 0,05 %) fue el segundo desinfectante más eficiente, mejorando su efecto a partir del minuto de exposición dentro de las concentraciones evaluadas. El producto Amonio cuaternario (cloruro de alquil dimetil bencil amonio 20 %) exhibe resultados más eficientes en las concentraciones superiores y recomendada a partir de los 5 minutos. De forma general, las clamidosporas de *Fusarium* spp. presentaron mayor resistencia al contacto con desinfectantes durante los 30 segundos de contacto, a diferencia de macroconidios. Asimismo, se comprobó que el efecto desinfectante de los productos mejora a medida que pasa el tiempo de exposición, y disminuye al diluirse. No obstante, se pueden tomar medidas preventivas confiables en base a los resultados de este estudio, debido a la congruencia que presentan con estudios anteriores ensayados contra cepas de Foc R4T, con el fin de evitar la entrada de este patógeno al territorio ecuatoriano.

Agradecimientos

Agradecemos a los directivos de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario del Ecuador por permitir la realización de este ensayo dentro de sus instalaciones y gestionar la adquisición de los distintos productos desinfectantes evaluados.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés entre la realización de este artículo y su financiamiento o afiliaciones laborales.

Contribución de los autores

Martín Marcial-Coba: Concepción y diseño del estudio, Diseño experimental del estudio, Análisis e interpretación de datos, Redacción de la primera versión del manuscrito, Revisión del manuscrito.

Alexander Toaza: Concepción y diseño del estudio, Diseño experimental del estudio, Análisis e interpretación de datos, Redacción de la primera versión del manuscrito, Revisión del manuscrito, Gestión del financiamiento.

Galo Ordoñez: Adquisición / Colección de datos, Análisis e interpretación de datos, Redacción de la primera versión del manuscrito.

Jeniffer Yáñez: Revisión del manuscrito, Gestión del financiamiento.

Elena Granda: Revisión del manuscrito.

Referencias bibliográficas

AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemist, Official Methods of Analysis. 18th Edition,

AOAC International, Suite 500, 481 North Frederick Avenue, Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA.

Al-daour A, Al-shawwa M, Abu-Naser S. 2019. Banana Classification Using Deep Learning. 3(12):1–8.

Alvarez H. 2018. Efectividad de los desinfectantes alternativos: ácido peracético u ortoftalaldehído en comparación con el glutaraldehído para lograr una desinfección óptima y sin daños, en el endoscopios flexibles. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Norbert Wiener. Lima, Perú.

Amani M, Avagyan G. 2014. Isolation and Identification of Fungal Pathogens on Banana Trees (*Musa acuminata* L.) in Iran. *Int Acad Journals Int J AgriScience*. 4(8):409–413.

Angel M, Rodríguez D. 2016. Aviso público del riesgo y situación actual. Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. México.

Audenaert K, Monbaliu S, Deschuyffeleer N, Maene P, Vekeman F, Haesaert G, De Saeger S, Eeckhout M. 2012. Neutralized electrolyzed water efficiently reduces *Fusarium* spp. in vitro and on wheat kernels but can trigger deoxynivalenol (DON) biosynthesis. *Food Control*. 23(2):515–521. doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.024.

Bennett RS, O'Neill W, Smith L, Hutmacher RB. 2011. Plant pathology and nematology: Activity of commercial detergents against conidia and chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *J Cotton Sci*. 15(2):162–169.

Berrang ME, Meinersmann RJ, Cox NA, Fedorka-Cray PJ. 2011. Application of chlorine dioxide to lessen bacterial contamination during broiler defeathering. *J Appl Poult Res*. 20(1):33–39. doi:10.3382/japr.2010-00178.

Burguet Lago N, Brito Godoy LC, Cánovas Borges I. 2013. Evaluation of the effectiveness of a disinfectant through the contact plate method. *Rev Cuba Farm*. 47(2):185–192.

Calderón JL. 2010. Artículo de revisión ÁCIDO HIPOCLOROSICO (HOCl) "Una nueva alternativa en antisepsia y desinfección desarrollada en Colombia." *Lab Actual*. (42):27–31. doi:10.18004/rvspmi/

Cedeño A. 2020. Medidas de prevención y contingencia de *Fusarium oxysporum* raza 4 en el cultivo de Banano, en la hacienda Elbas. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Técnica de Babahoyo. Ecuador.

Christen V, Faltermann S, Brun NR, Kunz PY, Fent K. 2017. Cytotoxicity and molecular effects of biocidal disinfectants (quaternary ammonia, glutaraldehyde, poly (hexamethylene biguanide) hydrochloride PHMB) and their mixtures in vitro and in zebrafish eleuthero-embryos. *Sci Total Environ*. 586:1204–1218. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.114.

Copes WE, Chastagner GA, Hummel RL. 2004. Activity of chlorine dioxide in a solution of ions and pH against *Thielaviopsis basicola* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis*. 88(2):188–194. doi:10.1094/PDIS.2004.88.2.188.

Cowan RE, Manning AP, Ayliffe GAJ, Axon ATR, Causton JS, Cripps NF, Hall R, Hanson PJV, Harrison J, Leicester RJ, et al. 1993. Aldehyde disinfectants and health in endoscopy units the report of a working party of the british society of gastroenterology endoscopy committee. *Gut*. 34(11):1641–1645. doi:10.1136/gut.34.11.1641.

Davicino R, Mattar MA, Casali YA, Correa SG, Pettenati EM, Micalizzi B. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev Peru Biol*. 14(2):247–251. doi:10.15381/rpb.v14i2.1784.

- Dita, M. A.; Ramos, E. E.; Pérez LF. 2013. Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria, OIRSA. San Salvador, El Salvador.
- Dita M, Barquero M, Heck D, Mizubuti ESG, Staver CP. 2018. Fusarium wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Front Plant Sci.* 871(October):1–21. doi:10.3389/fpls.2018.01468.
- Dita M, Martínez De La Parte E. 2014. Technical Manual Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama Disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4(TR4). FAO. 4(May):1–74.
- Dita MA, Waalwijk C, Buddenhagen IW, Souza JT, Kema GHJ. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathol.* 59(2):348–357. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x.
- FAO. 2019. Análisis del mercado del banano: resultados preliminares 2019. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma.
- Fernandez-Crehuet M, Espigares M, Moreno E, Espigares E. 2013. Specificity of the neutralizers as the cause of errors in evaluating disinfectant efficacy: an assessment of triclosan. *Lett Appl Microbiol.* 57:517–525.
- Finch W, Fay Z. 1994. United States Patent: Fortified glutaraldehyde chemical sterilant/disinfectant. (19).
- Flamenco J, Guevara G. 2011. Formulación de Tres Productos Desinfectantes y Evaluación de Su Actividad Antimicrobiana. Tesis de pregrado. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Gonsabay R. 2014. Cultivo del banano en Ecuador. *AFESE*:113–142.
- Guentzel JL, Lam KL, Callan MA, Emmons SA, Dunham VL. 2010. Postharvest management of gray mold and brown rot on surfaces of peaches and grapes using electrolyzed oxidizing water. *Int J Food Microbiol.* 143(1–2):54–60. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.028.
- Guerra NR, Chávez M, Treviño RS, García JF, Torres JA, Méndez A, Marroquín AG. 2019. Effects of Neutral Electrolysed Water on tomato seeds artificially contaminated with *Fusarium* and *Aspergillus*. *Seed Sci Technol.*:211–227. doi:10.15258/sst.2019.47.2.08
- Hwang SC, Ko WH. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Dis.* 88(6):580–588. doi:10.1094/PDIS.2004.88.6.580.
- IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- ICA. 2019. La Federación Nacional de Cafeteros se une a la campaña para la prevención del Fusarium R4T. Inst Colomb Agropecu. Colombia.
- ICA. 2020. Resolución No.072820. <https://www.ica.gov.co/getattachment/be3be9ed-b1aa-43f1-99f6-637bfde76318/2020R72820.aspx>
- ISO 21527-2. 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeast and molds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.
- Kahrs R. 2008. Principios generales de la desinfección. *Organ Mund Sanid Anim.* 14(1):143–163.

- Kilvington S, Lam A, Nikolic M, Brady N. 2013. Resistance and growth of *Fusarium* species in contact lens disinfectant solutions. *Optom Vis Sci.* 90(5):430–438. doi:10.1097/OPX.0b013e31828f4dfe.
- Lee YJ, Jeong JJ, Jin H, Kim W, Jeun YC, Yu GD, Kim KD. 2019. In vitro and in vivo inhibitory effects of gaseous chlorine dioxide against *Fusarium oxysporum* f. Sp. batatas isolated from stored sweetpotato: Study II. *Plant Pathol J.* 35(5):437–444. doi:10.5423/PPJ.OA.04.2019.0078.
- Li R, Baysal-Gurel F, Abdo Z, Miller SA, Ling KS. 2015. Evaluation of disinfectants to prevent mechanical transmission of viruses and a viroid in greenhouse tomato production. *Viol J.* 12(1). doi:10.1186/s12985-014-0237-5.
- Lin Y, Hussain M, Avery PB, Qasim M, Fang D, Wang L. 2016. Volatiles from plants induced by multiple aphid attacks promote conidial performance of *Lecanicillium lecanii*. *PLoS One.* 11(3):1–14. doi:10.1371/journal.pone.0151844.
- Linfield C. 1991. A Comparative Study of the Effects of Five Chemicals on the Survival of Chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi*. *J Phytopathol.* 131:297–304.
- Loor, E.; Gordon T. 2013. Evaluación del proceso de limpieza y desinfección en el área estéril del laboratorio farmacéutico Maquipharma S.A.
- Medina L, Valencia L. 2008. Evaluación de la eficacia de un desinfectante de alto nivel, a base de peróxido de hidrógeno, empleado en la esterilización de dispositivos e instrumentos hospitalarios.
- Meldrum RA, Daly AM, Tran-Nguyen LTT, Aitken EAB. 2013. The effect of surface sterilants on spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Crop Prot.* 54:194–198. doi:10.1016/j.cropro.2013.08.014.
- Miranda B. 2019. *Fusarium* R4T, el devastador hongo por el que declaran la primera emergencia nacional en América Latina y que preocupa a la industria del banano - BBC News Mundo. BBC News Mundo.
- Molina, B.; Sinohin, V.; Baroña L. 2009. Status of Tropical race 4 of Panama Wilt in Asia. *Prevention.* (June):1.
- Moore NY, Pegg KG, Smith LJ, Langdon PW, Bentley S, Smith MK. 2001. *Fusarium* wilt of banana in Australia.
- Nel B, Steinberg C, Labuschagne N, Viljoen A. 2007. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Prot.* 26(4):697–705. doi:10.1016/j.cropro.2006.06.008.
- Nguyen TV., Tran-Nguyen LTT, Wright CL, Trevorrow P, Grice K. 2019. Evaluation of the Efficacy of Commercial Disinfectants Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 1 and Tropical Race 4 Propagules. *Plant Dis. Vol.* 103:721–728.
- Nogueira D. 2013. Estudio de tensioactivos aniónicos y catiónicos derivados de lisina: interacción con membranas celulares, desarrollo de sistemas nanoestructurados para la liberación intracelular y evaluación toxicológica in vitro.
- Ocampo L, Banegas M, Sumano H, Alfonseca-Silva E, Campillo-Navarro M, Soria-Castro R, Aquino I. 2019. Evaluation of mycobactericidal and brucellicidal efficacy of an aldehyde and quaternary ammonium solution and a mixture of phenolic compounds. *Isr J Vet Med.* 74(4):190–195.
- Odorcic S, Haas W, Gilmore MS, Dohlman CH. 2015. Fungal infections after boston type 1 keratoprosthesis implantation: Literature review and in vitro antifungal activity of hypochlorous

- acid. *Cornea*. 34(12):1599–1605. doi:10.1097/ICO.0000000000000639.
- ONU. 2019. Fácil de propagar y difícil de eliminar, la nueva plaga que amenaza el banano y el plátano en América Latina. Not ONU.
- Pérez L. 2015. Fusarium Wilt (Panama Disease) of Bananas: An Updating Review of the Current Knowledge on the Disease and Its Causal Agent.
- Pérez L. 2015. Las Mejores Prácticas Para la Prevención de la Raza 4 Tropical de la Marchitez por Fusarium y otras enfermedades exóticas en fincas bananeras. *Fitosanidad*. 19: 243-250
- Ploetz RC. 2006. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*. 96(6):653–656. doi:10.1094/PHYTO-96-0653.
- Robles MDM, Villegas ES, Cortez OM, Castellanos IEG, Plascencia PCM, Esparza LMA. 2018. Evaluación de la eficiencia de desinfectantes comerciales para uso alimentario en el control de crecimiento *Escherichia coli*. *Av Investig en Inocuidad Aliment*. 1(1):5–8.
- Robson MC, Payne WG, Ko F, Mentis M, Donati G, Shafi SM, Culverhouse S, Wang L, Khosrovi B, Najafi R, et al. 2007. Hypochlorous Acid as a Potential Wound Care Agent: Part II. Stabilized Hypochlorous Acid: Its Role in Decreasing Tissue Bacterial Bioburden and Overcoming the Inhibition of Infection on Wound Healing. *J Burns Wounds*. 6:e6.
- Rodriguez MAD, Vicente LP, Martínez E. 2014. INOCULATION OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* CAUSAL AGENT OF FUSARIUM WILT IN BANANA. *Workshop Diagnosis Fusarium Wilt*. 4(May):1–74.
- Rood L, Koutoulis A, Bowman JP, Evans DE, Stanley RA, Kaur M. 2018. Control of microbes on barley grains using peroxyacetic acid and electrolysed water as antimicrobial agents. *Food Microbiol*. 76:103–109. doi:10.1016/j.fm.2018.05.002.
- Scarlett K, Collins D, Tesoriero L, Jewell L, van Ogtrop F, Daniel R. 2016. Efficacy of chlorine, chlorine dioxide and ultraviolet radiation as disinfectants against plant pathogens in irrigation water. *Eur J Plant Pathol*. 145(1):27–38. doi:10.1007/s10658-015-0811-8.
- Rodriguez M. 2012. Mal De Panamá: Medidas De Control Y Prevención Información. Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural. Cabildo de Tenerife. España.
- Soto M. 2011. Situación y Avances Tecnológicos en la Producción Bananera Mundial. *Rev Bras Frutic*. 33(SPEC. ISSUE 1):013–028. doi:10.1590/s0100-29452011000500004.
- Takahashi D, Fava C. 2011. Uso de glutaraldehído en la desinfección de incubadoras. XXII Congreso Latinoamericano de Avicultura 2011. Buenos Aires, Argentina.
- Tezel U, Pavlostathis S. 2015. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr Opin Biotechnol*. 33:296–304.
- Torres N, Araujo F. 2008. Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de fitoterapéuticos en laboratorios Pronabell. LTAD.
- Vásquez A, Villarreal T, Rodríguez G. 2016. Effectiveness of neutral electrolyzed water on incidence of fungal rot on tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.). *J Food Prot*. 79(10):1802–1806. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-494.
- Vásquez R. 2010. El impacto del comercio del Banano en el desarrollo del Ecuador. *AFESE Temas Int*. 53(53):167–182.
- Vijayakumar R, Sandle T. 2018. A review on biocide reduced susceptibility due to plasmidborne

antiseptic-resistant genes—special notes on pharmaceutical environmental isolates. *J Appl Microbiol.* 126:1011–1022.

Villaverde J. 2018. Fusarium. Todo lo que necesitas saber sobre este género. *Plantamus*. <https://plantamus.com/blog/todo-sobre-fusarium/>

Warman N, Aitken E. 2018. The Movement of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. *Front Plant Sci.* 9(1748):1–9.

Zubel I. 2020. Effect of cations on silicon anisotropic etching process in solutions containing TMAH and TMAH with tensioactive compounds. *Sensors Actuators, A Phys.* 303:111829. doi:10.1016/j.sna.2020.111829.

El losartán disminuye la expresión del receptor para compuestos de glicación avanzada en el tejido cardiaco de ratas diabéticas

Losartan Decreases Receptor Expression for Advanced Glycation Compounds in Heart Tissue of Diabetic Rats

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen 42. No. 1, Mayo 2021

Nelson Muñóz¹, Jesús Mosquera², Adriana Pedreañez^{3*}

¹Universidad Nacional del Chimborazo. Facultad de Ciencias de la Salud. Riobamba. Ecuador.

²Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette". Maracaibo, Venezuela.

³Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis. Maracaibo, Venezuela.

*Autor de Correspondencia:
apedreanez@gmail.com, ORCID:
<https://orcid.org/0000-0002-3937-0469>

Recibido 7-12-2020
Aceptado 6-04-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i1.883

e-ISSN 2477-9148

© 2021. Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia CC BY 4.0

Como citar este artículo:
Muñoz N, Mosquera J, Pedreañez A. 2021. El losartán disminuye la expresión del receptor para compuestos de glicosilación avanzada en el tejido cardiaco de ratas diabéticas. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 42(1): 27-36. doi: 10.26807/remcb.v42i1.883

Resumen.- El receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) puede interactuar con diversos ligandos e inducir procesos inflamatorios. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del enalapril y losartán sobre la expresión de RAGE en el tejido cardíaco en un modelo experimental de diabetes. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos, con un peso de 150 - 200 g. La diabetes se indujo en 30 ratas mediante la administración intravenosa de una sola dosis de 55 mg/Kg de peso corporal de estreptozotocina (ETZ). Se estudiaron los siguientes grupos: ratas control, diabéticas, diabéticas tratadas con losartán y diabéticas tratadas con enalapril. La expresión de RAGE en miocardio se determinó por inmunofluorescencia indirecta. Se observó un aumento significativo en la expresión de RAGE en los animales diabéticos versus los controles ($p < 0.01$), hubo una disminución en la expresión de RAGE miocárdico, sólo en los animales tratados con losartán versus los diabéticos sin tratamiento ($p < 0.05$). En conclusión, en el modelo experimental de diabetes inducida por ETZ, existe un incremento en la expresión miocárdica de RAGE, la cual puede revertirse mediante el tratamiento con losartán lo cual indica la participación del sistema renina angiotensina en los mecanismos relacionados con el daño cardíaco durante la diabetes.

Palabras clave: diabetes, enalapril, losartan, miocardio, RAGE

Abstract.- The receptor for advanced glycation end products (RAGE) can interact with various ligands and induce inflammatory processes. The aim of this research was to determine the effect of enalapril and losartan on the expression of RAGE in cardiac tissue in an experimental model of diabetes. Male Sprague-Dawley rats weighing 150 - 200 g were used. Diabetes was induced in 30 rats by intravenous administration of a single dose of 55 mg/kg body weight of streptozotocin (STZ). The following groups were studied: control, diabetic, losartan-treated and enalapril-treated diabetic rats. The RAGE expression in myocardium was determined by indirect immunofluorescence. A significant increase in the RAGE expression was observed in diabetic animals versus controls ($p < 0.01$), there was a decrease in myocardial RAGE expression, only in animals treated with losartan versus untreated diabetics ($p < 0.05$). In conclusion, in the experimental model of STZ-induced diabetes, there is an increase in myocardial RAGE expression, which can be reversed by treatment with losartan indicating the involvement of the angiotensin renin system in the mechanisms related to heart damage during diabetes.

Keywords: diabetes, enalapril, losartan, myocardial, RAGE

Introducción

Existe un alto índice de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardíaca en los pacientes con diabetes (Hass y MacDonnell 2018; Varma et al. 2018; Alegria et al. 2007). Sin embargo los mecanismos involucrados en la enfermedad cardiovascular en estos pacientes permanecen bajo estudio. La hiperglicemia crónica asociada a la diabetes da lugar a la glicación no enzimática de proteínas, cuando los azúcares reductores como la glucosa reaccionan con los grupos amino libres de las proteínas, dando origen a la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) por sus siglas en inglés (advanced glycation end products) (Stefano et al. 2016; Kehm et al. 2019).

Cuando los AGEs se unen a su receptor específico RAGE (receptor for advanced glycation end products) se desencadenan una serie de respuestas intracelulares que traen como consecuencia la producción de mediadores proinflamatorios los cuales han sido implicados en la patogénesis de las complicaciones durante la diabetes. (Leung et al. 2016). Varios mecanismos moleculares asociados a la diabetes promueven la inflamación del miocardio. La vía de señalización que involucra al factor de transcripción NF- κ B y el sistema renina – angiotensina (SRA) están fuertemente activados en el corazón diabético y por lo tanto promueven la inflamación en dicho tejido. (Teissier y Boulanger 2019; Kass 2003).

Se ha descrito que los fármacos que bloquean el SRA, bien sea inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) como el enalapril o antagonistas de los receptores AT1 como el losartan, poseen un efecto beneficioso sobre las alteraciones cardíacas durante la diabetes. (Scheen 2004; El Desoky 2011). Los datos sugieren que tanto la angiotensina II como la activación de RAGE están relacionadas con la inflamación y el desarrollo de las complicaciones cardíacas, sin embargo las interacciones entre ambas moléculas durante la enfermedad permanece desconocida. Es por ello que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del enalapril y el losartán sobre la expresión de RAGE en el tejido cardíaco de ratas con diabetes inducida experimentalmente.

Materiales y Métodos

Inducción de diabetes experimental con estreptozotocina .- Para el estudio se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos con peso aproximado de 150 - 200 g, procedentes del bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Altos de Pipe del Estado Miranda. El modelo experimental de diabetes se indujo en 30 ratas mediante la administración intravenosa (i.v) de una sola dosis de (55 mg/Kg de peso corporal de estreptozotocina (ETZ); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluida en buffer citrato 10mM, pH 4,5. Los animales controles (n=10) recibieron buffer citrato 10mM, pH 4,5 i.v.

Durante tres días luego de la inducción de la diabetes, se les suministró a los animales glucosa al 5% como sustituto del agua. La aparición de la hiperglicemia se determinó mediante la técnica de la glucosa oxidasa/peroxidasa utilizando un monitor Prestige IQ Smart System, en sangre extraída de la cola del animal una semana luego de inducir la diabetes.

Protocolo experimental. - Los animales que desarrollaron hiperglicemia después de una semana y se mantuvieron con valores de glucosa sanguínea mayores a 200 mg/dl durante 4 semanas, se dividieron a su vez en tres grupos dos de los cuales recibieron tratamiento durante 4 semanas adicionales con inhibidores del sistema renina – angiotensina.

Grupo ETZ + Vehículo: recibió vía oral 500 μ l de agua destilada. Grupo ETZ + Losartan: recibió vía oral 15 mg/kg/día de losartan. (losartan sodico; Merck & Co, Kenilworth, New Jersey, United States). Grupo ETZ + Enalapril: recibió vía oral 18 mg/kg/día de enalapril. (Merck Sharp & Dohme, Chalfont, Pennsylvania, United States) (Muñoz et al. 2011).

El losartán es un antagonista de los receptores AT1 de la Angiotensina II (Smith 2008); mientras que el enalapril es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I (Vargas et al. 2012). Las drogas y el agua destilada se administraron diariamente por gavaje gástrico desde la cuarta semana de diabetes hasta la octava semana. Todos los animales fueron sacrificados a la octava semana. El peso de los animales se monitoreó antes de inyectar el agente diabético (ETZ)

o el vehículo, antes de comenzar el tratamiento con losartan o enalapril, y al momento de los sacrificios.

Una vez finalizadas las 4 semanas de tratamiento, los animales se anestesiaron utilizando una inyección intraperitoneal de 100 mg/Kg de tiobarbitúrico y se les realizó una laparotomía. Se hizo una punción a la aorta abdominal para la toma de muestra de sangre; seguidamente se abrió la cavidad torácica y se perfundió el corazón con solución salina fisiológica 0.9 % a través del ventrículo izquierdo. Posteriormente se procedió a la toma de biopsias de corazón las cuales fueron embebidas en Tissue Tek (Miles Inc. Diagnostic Division, Kankakee, USA) y congeladas utilizando una mezcla de hielo seco y acetona y almacenadas a -70°C hasta su utilización para los estudios de inmunofluorescencia. Todos los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos del comité de bioética y bioseguridad del FONACYT y el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia (Maracaibo, Venezuela).

Estudios de inmunofluorescencia para la determinación de la expresión de RAGE.- Se realizaron cortes de 4µm de las biopsias obtenidas de tejido cardíaco, se fijaron con acetona y se determinó mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta la expresión de RAGE (Rabbit anti-rat RAGE. ab3611; Abcam, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, UK).

Las secciones de tejido luego de ser fijadas, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, para posteriormente ser incubadas con un anticuerpo secundario hecho en cabra conjugado con rodamina y dirigido contra IgG de conejo (goat anti-rabbit IgG rhodamine conjugated. Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finalmente a las secciones de tejido cardíaco se les colocó una solución de p-fenilendiamina (PPD) en PBS-glicerol. La evaluación de la fluorescencia se realizó con un microscopio dotado de un sistema de epifluorescencia (Axioscop, Zeiss, Germany). Los resultados se presentaron como células positivas por mm² de tejido de 20 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente.

Análisis estadístico .- Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Para estudiar las diferencias entre los grupos controles y los experimentales se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía con post-prueba de Bonferroni's para establecer comparaciones intergrupales. Se consideró como estadísticamente significativa todo valor de $p < 0,05$.

Resultados

La tabla 1, muestra los pesos y la concentración de glicemia en los diferentes grupos estudiados. La inyección de ETZ produjo animales diabéticos con altos niveles de glucosa en la sangre, acompañados de una disminución de peso en comparación con los controles ($*p < 0,001$ vs control). Los animales diabéticos tratados con enalapril mostraron valores similares de glucosa en la sangre a los observados en ratas diabéticas no tratadas. Por otra parte, los animales que recibieron losartan, mostraron niveles más altos de glicemia con respecto al grupo tratado con enalapril. Sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa. El tratamiento farmacológico no tuvo efectos sobre el peso de los animales diabéticos.

El análisis inmunohistoquímico mostró un aumento en el número de células positivas para RAGE en el tejido miocárdico de los animales diabéticos (Figuras 1 y 2). Sólo los animales tratados con losartán mostraron una disminución en el número de células que expresaban RAGE a nivel de miocardio (Figura 1).

Tabla 1. Pesos y glicemias de los diferentes grupos estudiados a las 8

Grupos	Peso (g)	Glicemia (mg/dL)
Controles	364.55 ± 26.73	116.30 ± 16.91
ETZ	262.83 ± 40.46*	430.83 ± 103.81*
ETZ-Losartan	235.67 ± 46.19*	>600*
ETZ-Enalapril	236.68 ± 29.17*	523.50 ± 40.30*

* $p < 0,001$ vs Control

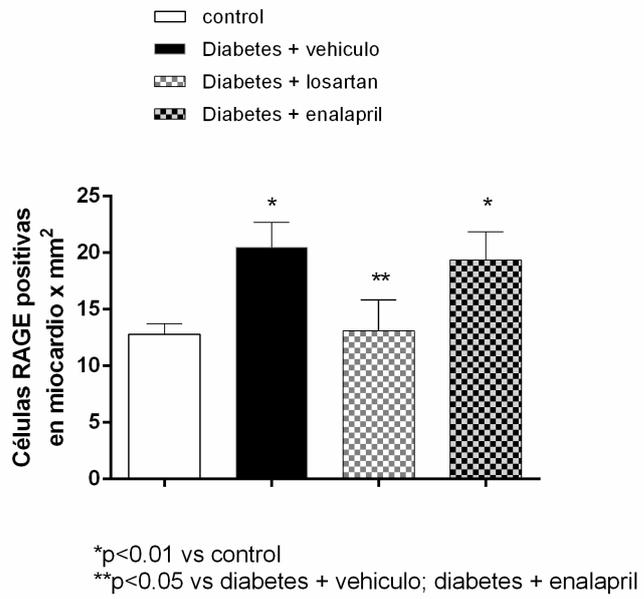


Figura 1. Expresión de RAGE en el tejido miocárdico en los diferentes grupos estudiados. Se observó un incremento en la expresión de RAGE en las ratas diabéticas el cual disminuyó con el tratamiento con losartán.

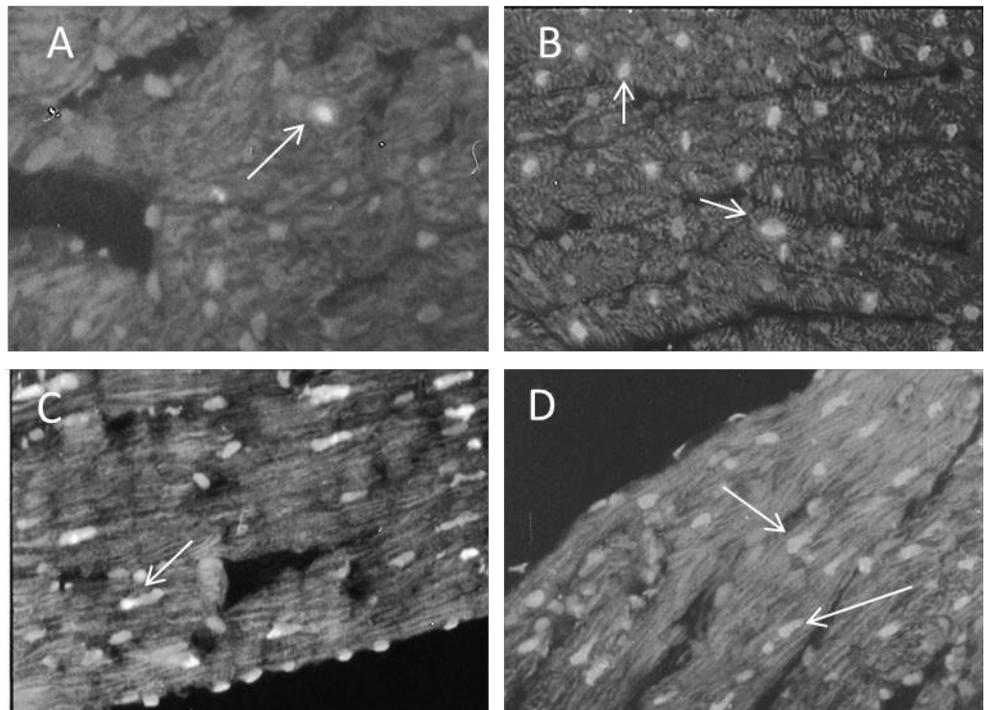


Figura 2. Expresión de RAGE en miocardio de ratas controles y ratas diabéticas. (A) Expresión de células RAGE + en el tejido miocárdico de ratas control; (B) expresión de RAGE en miocardio de ratas diabéticas no tratadas que recibieron sólo vehículo; (C) Expresión disminuida de RAGE en el tejido cardiaco de ratas diabéticas tratadas con losartan; (D) ratas diabéticas tratadas con enalapril. Las flechas señalan células RAGE positivas. Magnificación original 600X.

Discusión

Las complicaciones cardiovasculares son la principal causa de mortalidad y morbilidad en los pacientes diabéticos. Los cambios en la estructura y función del miocardio que se desarrollan como consecuencia de la diabetes se han denominado cardiomiopatía diabética (Haas y McDonnell 2018). A partir del análisis de varios modelos animales de diabetes tipo 1 y tipo 2, se han propuesto numerosos mecanismos moleculares que pueden contribuir al desarrollo de esta alteración (Mozaffarian et al. 2015; McClelland et al. 2015; Bugger y Abel 2014). En la actualidad hay suficiente evidencia que sugiere que los pacientes diabéticos están sometidos a un gran número de perturbaciones celulares y moleculares que causan anomalías estructurales y funcionales en el miocardio y en la vasculatura, conduciendo a inflamación, fibrosis y posterior desarrollo de cardiomiopatía diabética (Bugger y Abel 2014).

Se ha demostrado que la hiperglicemia induce la formación de AGEs y la expresión de su receptor RAGE, lo cual trae como consecuencia la activación de procesos inflamatorios. En este sentido, varios trabajos de investigación han reportado altos niveles plasmáticos de AGEs tanto en pacientes con diabetes como en modelos animales de diabetes experimental (Stefano et al. 2016; Kehm et al. 2019). La unión de RAGE a los productos de glicación avanzada es un factor determinante que trae como consecuencia la activación de mecanismos inmunitarios. En general estos mecanismos convergen en la activación del factor de transcripción NF- κ B el cual promueve la síntesis de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión lo que contribuye al daño cardiovascular y puede resultar en inflamación crónica. En este sentido, la activación de RAGE y la posterior translocación del factor NF- κ B al núcleo se ha implicado en diferentes patologías humanas, incluyendo diabetes, Alzheimer, artritis, aterosclerosis y enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Leung et al. 2016; Teissier y Boulanger 2019) (Figura3).

La morbilidad y mortalidad debido a infarto al miocardio es alta en pacientes con diabetes (Hass y MacDonnell 2018; Varma et al. 2018; Alegria et al. 2007). Existen evidencias de que los AGEs tienen un papel en la patogénesis de las complicaciones cardíacas en pacientes con diabetes involucrando las interacciones AGE/RAGE (Kass 2003). Los AGEs son proteínas predominantemente de larga duración que se glucosilan después de la exposición prolongada a azúcares, lo que altera sus propiedades funcionales. El aumento de la formación de AGEs secundario a la hiperglicemia puede alterar las proteínas estructurales y conducir a un aumento de la rigidez del miocardio (Goldin et al. 2006). En este sentido, se ha reportado la acumulación cardíaca de AGEs en ratas con diabetes inducida por ETZ, mostrando que las alteraciones cardiovasculares durante la diabetes podrían ser iniciadas por la acumulación de AGEs y su posterior unión a RAGE con su consecuente activación (Jing et al. 2010).

En nuestro estudio, hemos identificado dos elementos claves que podrían tener un efecto sobre el daño al miocardio durante la diabetes: la hiperglicemia y el incremento en la expresión de RAGE en células cardíacas.

La relación entre la angiotensina II y los eventos cardiovasculares descritos en el modelo de diabetes experimental inducida con ETZ es desconocida. La Ang II es el principal efector biológico del SRA y se ha reconocido desde hace muchos años como un agente vasoconstrictor tanto local como sistémico, cuyas acciones pueden modificar la reabsorción de agua y sodio en los segmentos tubulares distales de la nefrona (no directamente, sino a través de la aldosterona). Además la angiotensina II es una potente molécula proinflamatoria que puede actuar sobre diferentes tejidos, incluyendo el tejido cardíaco (Muñoz et al. 2011; Wang et al. 2016; Miller y Arnold 2019). Esta acción de la angiotensina II sobre diversos tejidos es mediada a través de su unión a receptores AT1 y AT2 (Miller y Arnold 2019; Zhou et al. 2007).

La activación del SRA miocárdico promueve procesos de remodelación en el corazón. En tal sentido, se ha descrito que la acción antagonista de la aldosterona miocárdica tiene efectos beneficiosos sobre la hipertrofia de los miocitos cardíacos y la fibrosis miocárdica (Orea-Tejeda et al. 2007). Varios estudios han demostrado un aumento del contenido de tejido conectivo en corazones de ratones con diabetes por ETZ, que puede atenuarse mediante el tratamiento con el antagonista de la aldosterona (espironolactona) (Westermann et al. 2007). Por otra parte,

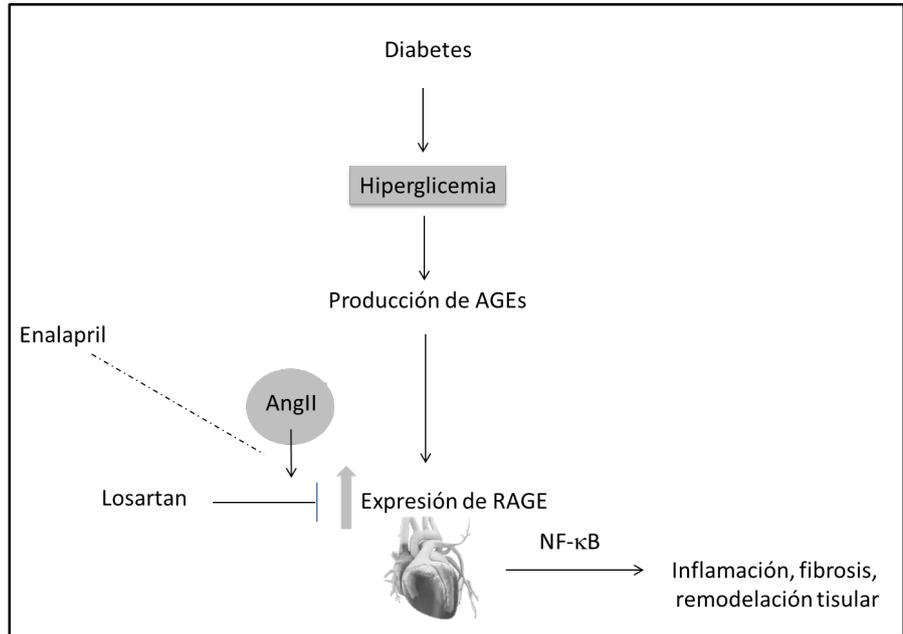


Figura 3. La hiperglicemia frecuente durante la diabetes, estimula la producción de AGEs e incrementa la expresión de RAGE en el tejido cardíaco. La activación del Eje AGEs/RAGE promueve la activación de NF-κB, lo cual trae como consecuencia la activación de mecanismos inflamatorios. La expresión de RAGE puede revertirse con el uso de losartán un antagonista de los receptores AT1 de la angiotensina II.

se ha demostrado que la densidad y síntesis del receptor de angiotensina II cardíaca aumenta en el tejido cardíaco en modelos animales de diabetes inducida por ETZ, y el aumento del estrés oxidativo y la apoptosis también pueden inhibirse, al menos parcialmente, mediante el tratamiento con bloqueadores de los receptores de angiotensina o inhibidores de la ECA (Singh et al. 2008). Adicionalmente, se ha descrito que la activación de RAGE por sus ligandos (AGEs) puede ser un efector potencial en la patología cardíaca en los pacientes con diabetes en donde están involucradas interacciones AGEs/ RAGE (Pickering et al. 2019).

En el presente estudio se observó un incremento en la expresión miocárdica de RAGE en los animales con diabetes inducida por estreptozotocina, sugiriendo un desencadenante potencial para eventos inflamatorios en el corazón. La expresión de RAGE estuvo disminuida en los animales diabéticos tratados con losartán, lo cual sugiere el papel de la angiotensina II en este proceso. Recientemente se ha reportado que la activación del receptor AT1 por la angiotensina II induce transactivación de RAGE y translocación de NF-NK-kB con la posterior expresión de genes proinflamatorios (Lim et al. 2018).

De acuerdo a este mecanismo, nuestros resultados sugieren que el losartán es capaz de bloquear el receptor AT1, de tal manera que se bloquee el efecto de la angiotensina II, lo que se traduce en una disminución en la expresión de RAGE (Muñoz et al. 2011; Goldin et al. 2006). Además se ha reportado que la hiperglicemia fue capaz de activar el sistema renina angiotensina en un modelo de diabetes mellitus inducido por ETZ (Chen et al. 2018). E incrementó la expresión de angiotensina II en vasos sanguíneos cerebrales (Goldin et al. 2006). Sugiriendo una vía de activación, angiotensina II / RAGE en este modelo experimental.

En esta investigación, se observó un efecto diferencial del enalapril y el losartán sobre la expresión de RAGE. El enalapril no fue capaz de reducir la expresión de RAGE como si lo hizo el losartán. Estos fármacos tienen un mecanismo de acción diferente. El enalapril inhibe la acción de la ECA, mientras que el losartán bloquea el efecto de la Ang II porque antagoniza sobre su

receptor AT1 (Henriksen y Jacob 2003; Hunyady y Catt 2006), el cual media la mayoría de los efectos fisiopatológicos de la angiotensina II (vasoconstricción, estrés oxidativo, inflamación). La enzima convertidora de angiotensina cataliza la conversión de angiotensina I a angiotensina II, sin embargo se han descrito vías adicionales e independientes para la producción de angiotensina II que involucran la participación de proteasas de serina, siendo la enzima quimasa la más activa. La quimasa puede catalizar entre el 80-90% de la conversión de la angiotensina I hacia angiotensina II en el tejido cardíaco (Kinoshita et al. 1991; Urata et al. 1991; Urata et al. 1993). Debido a esto, los resultados observados en los animales diabéticos tratados con enalapril no son inesperados.

Aunque el papel del SRA a nivel cardíaco en el modelo de diabetes inducida por ETZ no ha sido estudiado ampliamente, los antecedentes estudiados sugieren que el SRA también se activa en el corazón y está involucrado en los eventos inflamatorios. Los experimentos en el presente estudio se realizaron usando estrategias dirigidas a bloquear el efecto de Ang II, como la inhibición de la ECA y el bloqueo del receptor AT1, condiciones que han sido muy útiles para determinar los efectos de Ang II en varias pruebas clínicas y modelos experimentales de diabetes, incluyendo el modelo ETZ (Ilatovskaya et al. 2015; Chen et al. 2018; Qien et al. 2018; Ogata et al. 2016; Lozano-Maneiro y Puente-García 2015). Además varios estudios, han demostrado un incremento significativo en la concentración de Ang II en modelos experimentales de diabetes inducida con ETZ (Fernandez-Fernandez et al. 2014; Schievink et al. 2016; Roscioni et al. 2014).

Conclusión

En el modelo experimental de diabetes inducida por ETZ, existe un incremento en la expresión miocárdica de RAGE, la cual puede revertirse mediante el tratamiento con losartán, lo cual indica la participación del sistema renina angiotensina en los acontecimientos moleculares relacionados con el daño cardíaco durante la diabetes.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette", Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Venezuela. No se recibió financiamiento adicional comercial, público, o de sectores sin fines de lucro.

Abreviaturas

ETZ: estreptozotocina,
 RAGE: receptor para productos finales de glicación avanzada
 SRA: Sistema Renina Angiotensina
 ECA: Enzima convertidora de angiotensina I
 Ang II: Angiotensina II
 NF- κ B: Factor nuclear de transcripción κ -B
 AGEs: Productos finales de glicación avanzada

Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer conflicto de intereses

Contribución de los autores

Nelson Muñoz: Adquisición/Colección de datos, Análisis e interpretación de datos, redacción.
 Jesús Mosquera: Concepción y diseño del estudio, Análisis e interpretación de datos y revisión del manuscrito

Adriana Pedreáñez: Revisión y Redacción de la versión final del manuscrito.

Referencias bibliográficas

Alegria JR, Miller TD, Gibbons RJ, Yi QL, Yusuf S, & Collaborative Organization of RheothRx Evaluation (CORE) Trial Investigators. 2007. Infarct size, ejection fraction, and mortality in diabetic patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Am heart J.* 154(4): 743–750.

- Bugger H, Abel ED. 2014. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 57(4): 660–671.
- Chen C, Li L, Qin H, Huang Z, Xian J, Cai J, Qin Y, Zhang J, Liang X. 2018. Effects of Irbesartan Pretreatment on Pancreatic β -Cell Apoptosis in STZ-Induced Acute Prediabetic Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018: 8616194.
- Chen CM, Juan SH, Chou HC. 2018. Hyperglycemia activates the renin-angiotensin system and induces epithelial-mesenchymal transition in streptozotocin-induced diabetic kidneys. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 19(3): 1470320318803009.
- El Desoky ES. 2011. Drug therapy of heart failure: an immunologic view. *Am J Ther*. 18(5): 416–425.
- Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, Gomez-Guerrero C, Egido J. 2014. Therapeutic approaches to diabetic nephropathy--beyond the RAS. *Nat Rev Nephro*. 10(6): 325–346.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. 2006. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 114(6): 597–605.
- Haas AV & McDonnell ME. 2018. Pathogenesis of Cardiovascular Disease in Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 47(1): 51–63.
- Henriksen EJ, Jacob S. 2003. Modulation of metabolic control by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *J Cell Physiol*. 196(1): 171–179.
- Hunyady L, Catt KJ. 2006. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*. 20(5): 953–970.
- Ilatovskaya DV, Levchenko V, Lowing A, Shuyskiy LS, Palygin O, Staruschenko A. 2015. Podocyte injury in diabetic nephropathy: implications of angiotensin II-dependent activation of TRPC channels. *Sci Rep*. 5, 17637.
- Jing YH, Chen KH, Yang, SH, Kuo, PC, Chen, JK. 2010. Resveratrol ameliorates vasculopathy in STZ-induced diabetic rats: role of AGE-RAGE signalling. *Diabetes Metab Res Re*. 26(3): 212–222.
- Kass DA. 2003. Getting better without AGE: new insights into the diabetic heart. *Circ Res*. 92(7): 704–706.
- Kehm R, Rückriemen J, Weber D, Deubel S, Grune T, Höhn A. 2019. Endogenous advanced glycation end products in pancreatic islets after short-term carbohydrate intervention in obese, diabetes-prone mice. *Nutr diabetes*. 9(1): 9.
- Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM, Husain A. 1991. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. *J Biol Chem*. 266(29): 19192–19197.
- Leung SS, Forbes JM, Borg DJ. 2016. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr Diab Rep*. 16(10): 100.
- Lim S, Lee ME, Jeong J, Lee J, Cho S, Seo M, Park S. 2018. sRAGE attenuates angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting RAGE-NF κ B-NLRP3 activation. *Inflamm Res*. 67(8): 691–701.
- Lozano-Maneiro L, Puente-García A. 2015. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Blockade in Diabetic Nephropathy. Present Evidences. *J Clin Med*. 4(11): 1908–1937.

- McClelland RL, Jorgensen NW, Budoff M, Blaha MJ, Post WS, Kronmal RA, Bild DE, Shea S, Liu K, Watson KE, et al. 2015. 10-Year Coronary Heart Disease Risk Prediction Using Coronary Artery Calcium and Traditional Risk Factors: Derivation in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) With Validation in the HNR (Heinz Nixdorf Recall) Study and the DHS (Dallas Heart Study). *J Am Coll Cardiol*. 66(15): 1643–1653.
- Miller, AJ, Arnold, AC. (2019). The renin-angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. *Clin Auton Res*. 29(2), 231–243.
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Després, JP, Fullerton HJ, Howard V, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. 2015. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 131(4): e29–e322.
- Muñoz M, Rincón J, Pedrañez A, Viera N, Hernández-Fonseca JP, Mosquera J. 2011. Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by adriamycin. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 12(4): 404–412.
- Ogata Y, Nemoto W, Nakagawasai O, Yamagata R, Tadano T, Tan-No K. 2016. Involvement of Spinal Angiotensin II System in Streptozotocin-Induced Diabetic Neuropathic Pain in Mice. *Mol Pharmacol*. 90(3): 205–213.
- Orea-Tejeda A, Colín-Ramírez E, Castillo-Martínez L, Asensio-Lafuente E, Corzo-León D, González-Toledo R, Rebollar-González V, Narváez-David R, & Dorantes-García J. 2007. Aldosterone receptor antagonists induce favorable cardiac remodeling in diastolic heart failure patients. *Rev Invest Clin*. 59(2): 103–107.
- Pickering RJ, Tikellis C, Rosado CJ, Tsorotes D, Dimitropoulos A, Smith M, Huet O, Seeber R M, Abhayawardana R, Johnstone EK, et al. 2019. Transactivation of RAGE mediates angiotensin-induced inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 129(1): 406–421.
- Qian X, Lin L, Zong Y, Yuan Y, Dong Y, Fu Y, Shao W, Li Y, Gao Q. 2018. Shifts in renin-angiotensin system components, angiogenesis, and oxidative stress-related protein expression in the lamina cribrosa region of streptozotocin-induced diabetic mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 256(3): 525–534.
- Roscioni SS, Heerspink HJ, de Zeeuw D. 2014. The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 10(2): 77–87.
- Scheen AJ. 2004. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. *Diabetes Metab*. 30(6): 498–505.
- Schievink B, Kröpelin T, Mulder S, Parving HH, Remuzzi G, Dwyer J, Vemer P, de Zeeuw D, Lambers Heerspink HJ. 2016. Early renin-angiotensin system intervention is more beneficial than late intervention in delaying end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 18(1): 64–71.
- Singh VP, Le B, Khode R, Baker KM, Kumar R. 2008. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes*. 57(12): 3297–3306.
- Smith DH. 2008. Comparison of angiotensin II type 1 receptor antagonists in the treatment of essential hypertension. *Drugs*. 68(9): 1207–1225.
- Stefano GB, Challenger S, Kream RM. 2016. Hyperglycemia-associated alterations in cellular signaling and dysregulated mitochondrial bioenergetics in human metabolic disorders. *Eur J Nutr*. 55(8): 2339–2345.

- Teissier T, Boulanger É. 2019. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. *Biogerontology*. 20(3): 279–301.
- Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A. 1993. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest*. 91(4): 1269–1281.
- Urata H, Kinoshita A, Perez DM, Misono KS, Bumpus FM, Graham RM, Husain A. 1991. Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase. *J Biol Chem*. 266(26): 17173–17179.
- Vargas R, Rincón J, Pedreañez A, Viera N, Hernández-Fonseca JP, Peña C, & Mosquera J. 2012. Role of angiotensin II in the brain inflammatory events during experimental diabetes in rats. *Brain Res*. 1453: 64–76.
- Varma U, Koutsifeli P, Benson VL, Mellor KM, Delbridge L. 2018. Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes - Experimental insights. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1864(5 Pt B): 1949–1959.
- Wang X, Ye Y, Gong H, Wu J, Yuan J, Wang S, Yin P, Ding Z, Kang L, Jiang Q, et al. 2016. The effects of different angiotensin II type 1 receptor blockers on the regulation of the ACE-AngII-AT1 and ACE2-Ang(1-7)-Mas axes in pressure overload-induced cardiac remodeling in male mice. *J Mol Cell Cardiol*. 97: 180–190.
- Westermann D, Rutschow S, Jäger S, Linderer A, Anker S, Riad A, Unger T, Schultheiss HP, Pauschinger M, Tschöpe C. 2007. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes*. 56(3): 641–646.
- Zhou J, Xu X, Liu JJ, Lin YX, Gao GD. 2007. Angiotensin II receptors subtypes mediate diverse gene expression profile in adult hypertrophic cardiomyocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 34(11): 1191–1198.

Formación de biofilm en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* de Quito y el PuyoBiofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from Quito and Puyo

Revista Ecuatoriana de Medicina
y Ciencias Biológicas
Volumen 42. No. 1, Mayo 2021

Andrés Sanguano¹, María Fernanda Yauri¹ e Iliana Alcocer^{1*}

¹Laboratorio de Microbiología,
Escuela de Ciencias Biológicas,
Pontificia Universidad Católica del
Ecuador, Quito, Ecuador.

*Autor de correspondencia:
iralcocer@puce.edu.ec

Recibido 15-01-2020
Aceptado 23-03-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i1.885

e-ISSN 2477-9148

© 2021. Este es un artículo
publicado en acceso abierto bajo
una licencia CC BY 4.0

Como citar este artículo:
Sanguano A., Yauri MF, Alcocer I.
2021. Biofilm formation in clinical
isolates of *Staphylococcus aureus*
and *Staphylococcus epidermidis*
from Quito and Puyo. Revista
Ecuatoriana de Medicina y Ciencias
Biológicas 42(1): 37-53. doi:
10.26807/remcb.v42i1.885

Resumen.- *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* presentan capacidad de formar biofilm. El biofilm es una matriz polimérica que facilita la supervivencia bacteriana y es codificado por el operon *ica* que involucra cuatro genes: *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*. El objetivo del presente estudio fue identificar la formación de biofilm en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* por prueba cualitativa en Agar Rojo Congo (ACR) e identificación de presencia de genes del locus *ica* mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se analizaron 99 aislados clínicos de *S. aureus* y *S. epidermidis* provenientes de tres hospitales de tercer nivel en Quito y el Puyo. Se usó como control la cepa American Type Culture Collection de *S. aureus* ATCC® 25923. Con la prueba de ACR se identificaron 29 aislados productores de biofilm: casi negro 3,00 %, negro con 16,00 % y muy negro 10,00 %. En contraste con la prueba de PCR se identificó 70,00 %, 35,00 %, 26,00 % y 66,00 % positivos para *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, respectivamente. La prueba de ACR es menos eficiente para identificar aislados productores de biofilm, mientras que la amplificación de genes *ica* es más efectiva para determinar la capacidad que tiene *S. aureus* o *S. epidermidis* para producir biofilm.

Palabras clave: agar rojo Congo, biofilm, estafilococos, factores de virulencia, genes *ica*.

Abstract.- *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* are capable to produce biofilm. The biofilm is a polymeric matrix that ease the bacterial survival and is produced by the locus *ica* which has four genes *icaA*, *icaB*, *icaC* and *icaD*. The objective of this study was to detect the presence of isolates that can produce biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by Congo red agar (CRA) and gen detection of the locus *ica* genes by polymerase chain reaction (PCR). 99 clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* from three third level hospitals in Quito and Puyo were analyzed. The strain of *S. aureus* ATCC® 25923 from the American Type Culture Collection was used as a control. With the CRA test 29 isolates with a phenotype capable of producing biofilm were identified: almost black 3,00 %, black 16,00 % and very black 10,00 %. Nevertheless, with the PCR test 70,00 %, 35,00 %, 26,00 % y 66,00 % of the isolates were positive for *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, respectively. The CRA test is less effective identifying isolates capable of producing biofilm, whereas the gene amplification of the *ica* genes is more effective at establishing whether an isolate of *S. aureus* or *S. epidermidis* is capable of producing or not.

Keywords: biofilm, Congo red agar, *ica* genes, staphylococci, virulence factors

Introducción

Staphylococcus es un género de bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, inmóviles, no esporuladas, productoras de la enzima catalasa y fermentadoras de glucosa. Estas bacterias son consideradas comensales al encontrarse en la piel y en las membranas mucosas del humano (Kleinschmidt et al. 2015). Su nombre proviene de los vocablos griegos *staphyle* (racimo de uvas) y *kokkus* (baya) que describen la forma en la que estas bacterias se ven bajo el microscopio (Pahissa 2009). Las colonias aisladas en medio sólido son redondas, de borde liso, convexas y con una superficie brillante (Cavallini 2005).

Las bacterias de este género se pueden separar en dos grupos basándose en la capacidad de algunas especies para producir la enzima coagulasa: las bacterias coagulasa positivas, como *S. aureus*, y coagulasa negativas, como *S. epidermidis* (Granslo 2012). Dentro de ambos grupos, las especies de mayor importancia médica son *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, aunque otras especies son potencialmente capaces de producir un cuadro patológico (Cavallini 2005).

La identificación de las bacterias que forman parte del género inicia con tinción Gram, para la descripción morfológica, pruebas de catalasa y oxidasa, y determinación de metabolismo anaerobio/fermentativo mediante el empleo de agar manitol salado (Koneman y Allen 2008).

Staphylococcus aureus (Rosenbach 1884) es considerado uno de los principales patógenos bacterianos responsables de infecciones comunitarias y relacionadas con el cuidado de la salud (Jaśkiewicz et al. 2019). Es una bacteria muy resistente al calor, la desecación y puede crecer en condiciones de alta salinidad. Esto facilita que el 20,00 % de la población sea portadora permanente de esta bacteria en fosas nasales y el 60,00 % actúan como portadores intermitentes (Carr et al. 2018).

Uno de los factores que complican el tratamiento de infecciones estafilocócicas son los factores de virulencia que las bacterias presentan. Estos elementos confieren a las bacterias la capacidad de ser más patogénica u obtener una ventaja de supervivencia. Entre los principales factores que le brindan a *S. aureus* su patogenicidad se destacan: la toxina de shock tóxico, producción de enzima coagulasa, producción de toxinas citolíticas, toxinas exfoliativas y la leucocidina de Panton-Valentine (Ji 2007). Gracias a éstas, *S. aureus* puede causar distintas enfermedades, dependiendo del sitio de infección, y desencadenar: endocarditis, fibrosis, neumonía necrotizante, shock tóxico y sepsis (Lim et al. 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde el año 2017 ha incluido a *Staphylococcus aureus* en la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, ubicándose en la prioridad 2: elevada (OMS 2017).

S. epidermidis (Winslow y Winslow 1908) Evans 1916, es una bacteria que forma parte de la microbiota de la piel y la mucosa de los seres humanos. Es capaz de sobrevivir a altas concentraciones de salinidad y se diferencia principalmente de *S. aureus* por su incapacidad de producir la enzima coagulasa (Otto 2009). Esta bacteria actúa como probiótico, evitando la colonización de las superficies corporales por bacterias patogénicas. En la piel, *S. epidermidis* fermenta el glicerol en ácido butírico y ácido acético, los cuales inhiben la colonización de *S. aureus* (Traisaeng et al. 2019).

En los últimos años, *S. epidermidis* se ha convertido en un patógeno frecuente, demostrando su habilidad para colonizar los nichos que un ambiente hospitalario ofrece (Heilmann et al. 2019). Entre los factores que facilitan a *S. epidermidis* causar una infección son: un sistema inmune comprometido o inmaduro (Dong et al. 2018), individuos que hayan pasado por intervenciones quirúrgicas (Kleinschmidt et al. 2015) y presencia de dispositivos médicos permanentes que ofrecen superficies de colonización (Oliveira et al. 2018).

El crecimiento de casos de *S. epidermidis* asociado a infecciones intrahospitalarias se debe a la producción de un biopolímero extracelular conocido como biofilm. Éste protege a las bacterias contra el sistema inmune del huésped y sirve como barrera contra tratamientos antibióticos (Heilmann et al. 2019).

El biofilm es una estructura común entre varios microorganismos, siendo una estructura fuerte y dinámica que brinda capacidad de adhesión y cohesión, propiedades mecánicas, fuentes de nutrientes, resistencia a drogas, resistencia al estrés ambiental y al sistema inmune del huésped. A éstas características se suman que provee de resistencia contra antibióticos, desinfectantes y antisépticos. El biofilm provee tolerancia contra deshidratación y luz ultravioleta. En el ambiente hospitalario, los aislados productores de biofilm, incrementan los costos generados en el cuidado de la salud y aumentan la permanencia del paciente, complicando aún más los cuadros infecciosos (Santos et al. 2018).

Existen dos tipos de biofilm conocidos en estafilococos, la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA, por sus siglas en inglés) y el biofilm PIA independiente (Arciola et al. 2015). El biofilm de tipo PIA o también conocido como poli-N-acetilglucosamina (PNAG) consiste de cadenas de poli- β (1-6)-N-acetilglucosamina, un glicosaminoglicano lineal que proporciona la adhesión intercelular de las células bacterianas (Arciola et al. 2015). Tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis*, el biofilm es codificado por el Operon *ica*, conformado por cuatro genes (*icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*). Estos genes codifican transferasas y deacetilasas que producirán cadenas con monómeros de N-acetilglucosaminas, que al final crearán las delgadas capas que constituyen el biofilm (Heilmann et al. 2019).

El biofilm de tipo PIA independiente es generado por diversas proteínas como la proteína asociada a biofilm (Bap), la proteína asociada a la acumulación (Aap), generalmente asociadas a estafilococos coagulasa negativos. Otro tipo de proteínas de superficie como SasG, SasC, proteína A, proteínas de unión a la fibronectina, también contribuyen a la formación de este tipo de biofilm (Arciola et al. 2015).

La producción de biofilm se gatilla por la presencia de factores externos como etanol, isopropanol y NaCl, que al estar presentes en ciertas concentraciones pueden requerir de mayor o menor producción de biofilm (O'Gara 2007; Luther et al. 2015). Otro factor regulador de la expresión de biofilm es el elemento transponible IS256, que se inserta en diferentes sitios del operon *ica*, inhibiendo la síntesis de biofilm en una cepa productora de biofilm. (Hennig y Ziebuhr 2008). Este es un proceso reversible, ya que después de unas cuantas generaciones las cepas pueden volver a producir biofilm (Ziebuhr et al. 1999; Hennig y Ziebuhr 2008).

El objetivo del presente estudio fue identificar la formación de biofilm tipo PIA en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* por prueba cualitativa en Agar Rojo Congo (ACR) e identificación de genes del locus *ica* por PCR. Teniendo así un diagnóstico temprano que ayudaría a la prevención de complicaciones en el tratamiento de infecciones estafilocócicas. Los tratamientos deben adaptarse dependiendo de la complejidad del biofilm que produzcan las bacterias, por la necesidad de usar diferentes tipos de agentes dispersores, que en conjunto con los antibióticos puedan actuar sobre las bacterias. Un riesgo de la dispersión del biofilm es que las colonias que se desprenden colonicen otros órganos, por lo que se recomienda realizar terapias combinadas de agentes dispersores con drogas antimicrobianas sistémicas (Zapotoczna et al. 2016).

Materiales y Métodos

Población de estudio.- Se empleó aislados clínicos donados por dos hospitales de tercer nivel de la ciudad de Quito y un hospital de tercer nivel de la ciudad del Puyo, durante el periodo de octubre del 2016 a mayo del 2017. Los aislados provienen de procesos infecciosos como: secreción ocular, vaginal, traqueal, faríngeo, abscesos, sangre, líquido espinal, líquido cefalorraquídeo, heridas y además se incluyeron catéteres que fueron sembrados en medios sólidos específicos. Los aislados fueron identificados como *S. epidermidis* o *S. aureus* en los hospitales mediante el uso de pruebas bioquímicas. Éstos fueron transportados en placas de agar nutriente y medios de transporte Stuart al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). La identificación de los aislados fue confirmada por desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) por sus siglas en inglés MALDI-TOF en URANTICORP S.A., Guayaquil. El estudio también empleó

la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 como referencia. Los aislados obtenidos forman parte de la Colección Bacteriana - Quito Católica (CB-QCA) y se les confirió un código propio de la colección. Para su procesamiento, las bacterias fueron reaisladas en placas de agar manitol salado (BBL™ BD) para verificación de su identificación y evidencia de ausencia de contaminación.

A partir de los aislados obtenidos sobre las placas de agar manitol salado, éstos fueron transferidos y sembrados en tubos que contenían 5,0 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés, BBL™ BD) a 37 °C por 18 horas. Luego de la incubación, a cada tubo se le añadió 30 % de glicerol, y se realizaron 4 alícuotas en microtubos de 1,5 mL. Dos alícuotas fueron almacenadas a -20 °C y 2 alícuotas fueron almacenadas a -80 °C.

Extracción de ADN.- La extracción se realizó a partir de los aislados conservados a -20 °C. Para su reactivación, las bacterias fueron cultivadas en caldo BHI (Difco™) durante 18 - 24 horas a 35 °C. Después, los aislados se sembraron sobre placas de agar manitol salado (BBL™ BD) durante 18 - 24 horas a 35 °C. Finalmente, al tercer día se realizó una transferencia de los aislados obtenidos de la placa a caldo Tripticasa de Soya (TSB, por sus siglas en inglés) (Difco™) durante 18 horas a 35 °C. Con los cultivos en TSB se utilizó el kit de extracción comercial de ADN "Wizard® Genomic DNA Purification kit" (PROMEGA®) siguiendo las indicaciones del fabricante para extracción de ADN de bacterias Gram positivas. La calidad y cantidad de ADN fue determinado con NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™).

Pruebas cualitativas.- Las pruebas cualitativas de expresión de biofilm se realizaron mediante el uso de agar Rojo Congo. Para su preparación se siguió el protocolo propuesto por Petrelli et al. (2006) que empleó: BHI agar (BBL™ BD); 0,8 g/L de Rojo Congo (BDH Chemicals Ltd.) y enriquecido con 36 g/L de glucosa para fomentar la producción de biofilm de tipo PIA. Los aislados obtenidos sobre placas de agar Manitol Salado (BBL™ BD) fueron transferidos a placas de agar Rojo Congo, con incubación por 18 horas a 37 °C, seguido de 12 horas a temperatura ambiente para continuar con las lecturas. El rojo Congo cambia el color de las colonias ante la presencia de los polisacáridos producidos para la producción del biofilm. Si las bacterias producen biofilm, las colonias serán de color negro. Los aislados que carezcan de esta capacidad fueron visualizados mostrando un color rojo (Freeman et al. 1989).

Los resultados se evaluaron según la coloración de las colonias en el medio, basándose en las escalas colorimétrica obtenidas de Arciola et al. (2002) que consta de seis categorías: 1) muy rojo, 2) rojo, 3) rojo oscuro, 4) casi negro, 5) negro y 6) muy negro.

Identificación de genes mediante PCR.- Mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron detectados los genes *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*). El volumen total de las reacciones de amplificación fue de 15 µL que contenían: 7,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA®); 0,6 µL de ADN; 0,6 µL de cebador forward; 0,6 µL de cebador reverse y 5,5 µL de agua grado molecular UltraPure™ Distilled water (Invitrogen).

Para *Staphylococcus epidermidis* se utilizaron cebadores para los genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* (Macrogen). Estos cebadores fueron tomados de la publicación de Paluch-Oleś et al. (2011) (Tabla 1) y se utilizaron las mismas condiciones propuestas por el autor, excepto por las temperaturas de templado de *icaA*, *icaB* e *icaC* que emplearon 52,3 °C, 57,6 °C y 40,6 °C respectivamente. Para *Staphylococcus aureus* se utilizaron los cebadores *icaA* e *icaD* (Macrogen) descritos por Haddad et al. (2018) (Tabla 2) utilizando las mismas condiciones de amplificación descritas en el estudio.

Los amplicones obtenidos por PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1 % mediante electroforesis, que incluyó un marcador de peso molecular de 100 pb (TrackIt™ 100 pb ADN Ladder, Invitrogen). El proceso de tinción del gel se realizó con fluorocromo SYBR™ Gold 10.000x (Invitrogen) sumergiendo el gel en esta solución durante 1 hora en un lugar oscuro. Los resultados fueron fotografiados utilizando el fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

Tabla 1. Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes para la producción de biofilm en *Staphylococcus epidermidis*

Cebadores*	Secuencias del cebador	Longitud del producto	Condiciones de PCR
<i>icaA forward</i>	5'-GACCTCGAAGTCAATAGAGGT-3'	814 pb	30 s 95 °C
<i>icaA reverse</i>	5'-CCCAGTATAACGTTGGATACC-3'		30 s 52,3 °C 1,5 min 72 °C 30 ciclos
<i>icaB forward</i>	5'-ATGGCTTAAAGCACACGACGC-3'	526 pb	1 min 95 °C
<i>icaB reverse</i>	5'-TATCGGCATCTGGTGTGACAG-3'		1 min 57,6 °C 1,5 min 72 °C 30 ciclos
<i>icaC forward</i>	5'-ATAAACTTGAATTAGTGTATT-3'	989 pb	30 s 95 °C
<i>icaC reverse</i>	5'-ATATATAAACTCTCTTAACA-3'		1 min 40.6 °C 1,5 min 72 °C 30 ciclos
<i>icaD forward</i>	5'-AGGCAATATCCAACGGTAA-3'	371 pb	1 min 94 °C
<i>icaD reverse</i>	5'-GTCACGACCTTTCTTATATT-3'		1 min 59 °C 2,5 min 72 °C 30 ciclos

*Referencia: Paluch-Oleś et al. 2011; pb = pares de bases

Resultados

Población de estudio.- Durante el periodo de colecta se obtuvieron 40 aislados del primer hospital de Quito, de los cuales 24/40 fueron identificados como *S. epidermidis* y 16/40 aislados como *S. aureus*. En el segundo hospital de Quito se colectaron 50 aislados, de los cuales 37/50 aislados correspondieron a *S. epidermidis* y 13/50 se identificaron como *S. aureus*. Finalmente, en el hospital de la ciudad del Puyo se colectaron 9 aislados de *S. aureus*. El total de aislados obtenidos fue de 99 aislados clínicos (61/99 *S. epidermidis* y 38/99 *S. aureus*). En el análisis se incluyó como cepa control a *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923. Todos los aislados fueron identificados usando el método MALDI-TOF.

Pruebas cualitativas.- Mediante las pruebas cualitativas en agar Rojo Congo se establecen fenotipos relacionados con la producción de biofilm y se clasifican en las variantes: casi negro, negro y muy negro. Las variaciones muy rojo, rojo y rojo oscuro se relacionan con la ausencia de biofilm (Figura 1).

En el primer hospital de Quito 14/40 (35,00 %) aislados tuvieron fenotipos positivos para la producción de biofilm, de los cuales 9 aislados fueron *S. epidermidis* y 5 aislados fueron *S. aureus*. En el segundo hospital de Quito 13/50 (26,00 %) aislados fueron positivos, donde 12 aislados correspondían a *S. epidermidis* y un aislado a *S. aureus*. En el hospital del Puyo solamente 1/9 (11,11 %) aislado mostró un fenotipo positivo a la producción de biofilm. En total de los aislados clínicos positivos a la presencia de biofilm determinado bioquímicamente mediante agar rojo Congo fue de 28/100 (28,28 %). Presentó también un fenotipo positivo la cepa ATCC® *S. aureus* 25923. Totalizando 29 aislados positivos para la producción de biofilm.

Los fenotipos más dominantes observados en la población de estudio fueron rojo y rojo oscuro presente en 35/100 y 25/100 respectivamente. El fenotipo negro se reportó en 16/100 aislados, el fenotipo muy negro se observó en 9/100 aislados, el fenotipo muy rojo en 11/100 y el fenotipo casi negro en 4/100 aislados. En la Figura 1 se puede ver los fenotipos obtenidos ordenadas de forma que se asemejen a la escala de Arciola et al. (2002), donde consta las seis categorías: muy rojo (Figura 1, A), rojo (Figura 1, B), rojo oscuro (Figura 1, C), casi negro (Figura 1, D), negro (Figura 1, E) y muy negro (Figura 1, F).

Tabla 2. Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes para la producción de biofilm en *Staphylococcus aureus*

Cebadores*	Secuencias del cebador	Longitud del producto	Condiciones de PCR
<i>icaA forward</i>	5'-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3'	188 pb	30 s 94 °C
<i>icaA reverse</i>	5'-TCTGGAACCAACATCCAACA-3'		30 s 55 °C 45 s 72 °C 30 ciclos
<i>icaD forward</i>	5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'	198 pb	45 s 72 °C
<i>icaD reverse</i>	5'-AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA-		30 s 94 °C 30 s 55 °C 45 s 72 °C 30 ciclos

*Referencia: Haddad et al. 2018; pb = pares de bases

El número de aislados con fenotipos positivos por especie para la producción de biofilm (casi negro, negro, muy negro) fueron muy bajos. Para *S. epidermidis*, la prueba bioquímica reveló la producción de biofilm en 21/61 aislados que representa el 34,42 %, y para *S. aureus*, 8/39 aislados que representa el 20,51 %. Los 71 aislados restantes de *S. aureus* y *S. epidermidis* presentaron fenotipos negativos para la producción de biofilm con resultados de muy rojo, rojo y rojo oscuro.

Resultados por PCR.- El resultado de las reacciones de amplificación para *S. epidermidis* mostró un porcentaje mayor al 50,00 % de la población con presencia de los genes *icaA*, *icaB*, *icaD*; mientras que para *icaC* fue menor al 50,00 %. En *S. epidermidis* el porcentaje de aislados positivos para *icaA* fue del 59,02% (36/61) (Figura 2, A), 57,38 % (35/61) para *icaB* (Figura 2, B), 42,62 % (26/61) para *icaC* (Figura 2, C) y 52,46 % (32/61) para *icaD* (Figura 2, D). En *S. aureus* el porcentaje de aislados positivos para los genes *icaA* (Figura 3, A) e *icaD* (Figura 3, B) fue del 87,18 % (34/39) para ambos genes.

El número de aislados con resultados positivos a la producción de biofilm y por especie es mayor con la determinación por PCR en relación con el análisis cualitativo. En *S. epidermidis* se registraron 36/61 (59,02%) aislados y en *S. aureus* 35/39 (89,74%) aislados positivos a la producción de biofilm.

En el primer hospital de Quito, 29/40 (72,50 %) aislados fueron positivos a alguno de los 4 genes *ica*, distribuyéndose en 17 aislados de *S. epidermidis* y 12 aislados *S. aureus*. En el segundo hospital de Quito, 32/50 (64,00 %) aislados fueron positivos a alguno de los cuatro genes, siendo 19 aislados *S. epidermidis* y 13 aislados *S. aureus*. En el hospital del Puyo, los 9 aislados de *S. aureus* fueron positivos a los genes *ica*. Incluyendo la cepa ATCC® fueron 71/100 aislados positivos dentro de la población.

Comparación de resultados de las pruebas cualitativas con los resultados de la PCR.- El número de aislados reconocidos mediante la prueba cualitativa positiva para la producción de biofilm con agar rojo Congo es menor a la cantidad de positivos obtenidos con las pruebas de PCR. Mediante la prueba cualitativa 29/100 (29,00 %) aislados presentan los fenotipos: casi negro, negro o muy negro, que los califica como productores de biofilm, mientras que con las PCR se registraron 71/100 (71,00 %) aislados que tuvieron alguno de los 4 genes *ica* (Tabla 3). Sin embargo, 11 aislados que poseían un fenotipo positivo para la producción de biofilm en el agar rojo Congo, no obtuvieron resultados positivos a las amplificaciones de los genes codificantes a la producción de este polímero.

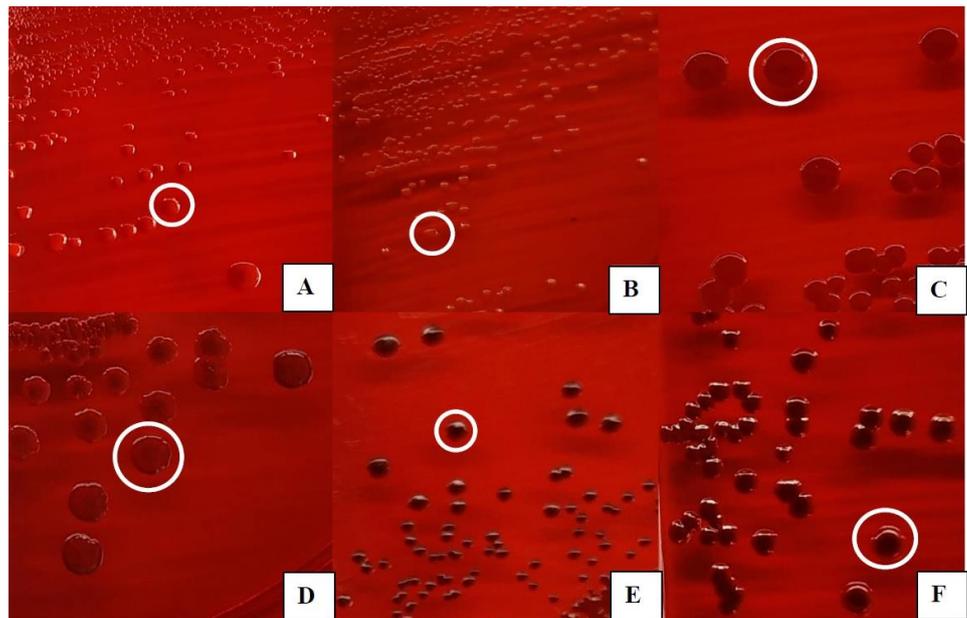


Figura 1. Patrón colorimétrico reconocido en las muestras colectadas. A) Muy rojo, CB-QCA 4588; B) Rojo, CB-QCA 4847; C) Rojo oscuro, CB-QCA 4714; D) Casi negro, CB-QCA 4620; E) Negro, CB-QCA 4814; F) Muy negro, CB-QCA 4659

Discusión

En la actualidad, se deben tomar en cuenta distintos factores al momento de tratar una infección bacteriana, ya que cada especie puede mostrar diferentes formas de combatir los agentes antimicrobianos. Los mecanismos primarios son las resistencias innatas, ya sean por: desactivación enzimática del agente, acumulación reducida del agente por afluencia reducida o eflujo incrementado, o distintos tipos de modificaciones del sitio blanco (Duijkeren et al. 2018).

De los distintos factores de virulencia que poseen las diversas especies bacterianas, tanto en *S. epidermidis* como en *S. aureus*, se puede observar un factor de virulencia en común, la producción de biofilm. Éste ha sido uno de los factores de virulencia que ha convertido a *S. epidermidis* como patógeno oportunista del ambiente hospitalario. La capacidad de producir biofilm, permite a *S. epidermidis* adherirse a varias superficies de aparatos médicos, resistir la acción de desinfectantes y antisépticos, y evitar el sistema inmune del hospedero, una vez que alcanzado al paciente (Otto 2009; Arciola et al. 2018). *S. aureus*, además de tener un arsenal de factores de virulencia, también posee los mismos genes *ica* para la producción de biofilm. Los genes *icaA* e *icaD* entre *S. aureus* y *S. epidermidis* poseen una similitud de 76 y 72 % respectivamente (Rohde et al. 2001). Por esta razón no se pudo utilizar los mismos cebadores para ambas especies y solo se usaron los genes *icaA* e *icaD* para *S. aureus*.

En la presente investigación las pruebas de rojo Congo mostraron una variabilidad en los fenotipos presentes en la población. De estos, los dominantes fueron los fenotipos rojo y rojo oscuro, y en menor cantidad los fenotipos negros relacionados con la producción de biofilm. Considerando a los fenotipos casi negro, negro y muy negro como biofilm positivos, se identificó que el 34,43 % de los aislados de *S. epidermidis* y el 20,51% de los aislados de *S. aureus* fueron positivos a la presencia de biofilm. Esto contrasta con los resultados obtenidos por los análisis por PCR, donde existieron un mayor número de aislados positivos a la presencia de genes codificantes para la producción de biofilm. Este resultado se puede deber a la necesidad de la bacteria a ser sometida a estrés ambiental o condiciones óptimas que estimulen a la bacteria a producir biofilm. Por ejemplo, la presencia de etanol, isopropanol, NaCl y un pH cercano a 7 favorecen la producción del polímero (O’Gara 2007; Luther et al. 2015; Tango et al. 2018).

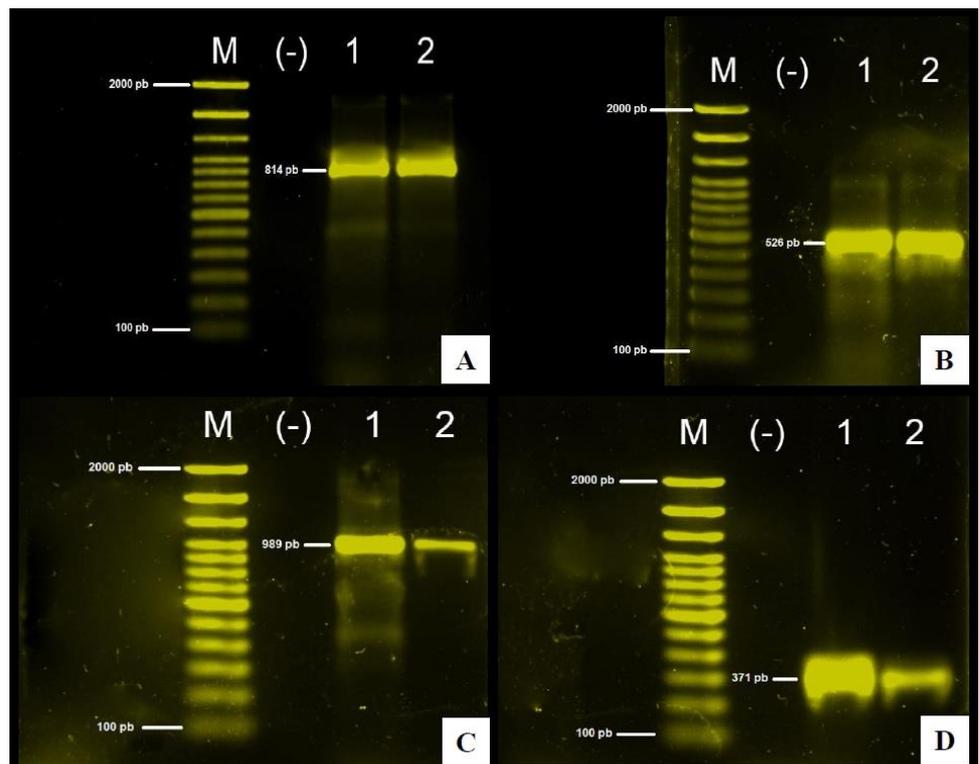


Figura 2. Geles representativos de los productos de amplificación obtenidos para los genes *ica* en *S. epidermidis*.

A) *icaA* (814 pb), M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4891; aislado 2, CB-QCA 4927; B) *icaB* (526 pb), M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4891; aislado 2, CB-QCA 4927; C) *icaC* (989 pb), M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4891; aislado 2, CB-QCA 4750; D) *icaD* (371 pb), M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4891; aislado 2, CB-QCA 4827.

Las bacterias empleadas en esta investigación fueron sometidas a un tipo de estrés ambiental al ser cultivadas en agar manitol salado previamente a la inoculación en agar rojo Congo. Pero la expresión también depende de varios factores que están constantemente regulando la producción de biofilm. El gen *icaR* codifica al represor del gen *icaA*, que se adhiere a la región promotora del locus *ica* (Conlon et al.2002; O’Gara 2007). Otro regulador es el elemento móvil IS256 que inhibe la producción de biofilm cuando se acopla en distintas regiones del locus *ica* (Ziebuhr et al. 1999; Arciola et al. 2015; Arciola et al. 2018).

Por esta razón, es necesario complementar los estudios cualitativos con el análisis molecular de los genes asociados a la producción de biofilm. Con las reacciones de PCR se incrementó el número inicial de aislados positivos a la producción de biofilm de 29/100 aislados a 71/100 aislados. Aunque el método de agar rojo Congo es utilizado generalmente para confirmar la presencia de biofilm, no siempre se puede determinar exactamente si el aislado es positivo a la presencia de genes *ica* productores de biofilm (Lee et al. 2016). Por esto se han propuesto modificaciones al método del agar rojo Congo para volverlo más efectivo en la detección de biofilm incrementando el estrés a la bacteria. Existen una variedad de propuestas como cambiar el agar de Infusión Cerebro Corazón (BHI agar) por Caldo Trypticasa Soya (TSB) (Lee et al. 2016), o añadir NaCl (Kaiser et al. 2013).

El porcentaje de aislados positivos a la presencia de biofilm después de las pruebas por PCR se incrementó, tanto como para *S. epidermidis* como para *S. aureus* (Tabla 4). En la literatura se pueden observar patrones similares donde se reporta mayor porcentaje de aislados positivos para genes *ica* en *S. aureus* que en *S. epidermidis*. En estudios realizados por Calà et al. (2015), de una población de *S. epidermidis* proveniente de la piel de pacientes hospitalizados los resultados positivos fueron del 42,85 % (45/105 aislados). Estudios de Solati et al. (2015) obtuvieron 35/80

aislados de *S. epidermidis* productores de biofilm provenientes de distintas muestras (orina 52,5 %, sangre 28,75 % y bolsas de diálisis 18,75 %). De éstos, existió una variación de presencia de genes relacionados con la cantidad de biofilm producido. Esto explicaría la variación y bajos positivos para la presencia de los genes *icaB* e *icaC* en los aislados de *S. epidermidis* de la presente investigación.

Existe una variedad de resultados sobre la presencia de los genes *ica* en *S. aureus*. Mirzaee et al. (2014) estudiaron 63 aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y encontraron una prevalencia del 60,30 % (38/63 aislados) para la presencia del gen *icaA* y del 100% (63/63 aislados) para la presencia del gen *icaD*. En Knobloch et al. (2002) entre 82 aislados de cultivos de sangre y 26 nasales de *S. aureus*, la totalidad poseía los genes *ica*. En Rhode et al. (2001) esto se explica como una variación dependiente del origen de las muestras. Esto se podía notar en Arciola et al. (2001), donde solo el 61,00% de su población de *S. aureus* provenientes de infecciones por catéteres poseían los genes *icaA* e *icaD*. Pero en el estudio de Arciola et al. (2005) con muestras obtenidas de prótesis ortopédicas, el porcentaje de positivos aumentó significativamente.

En esta investigación los aislados provienen de distintos tipos de muestras (sangre, punta de catéter, heridas, abscesos) y los porcentajes de resultados positivos varían, tanto por especie como por muestra; por lo que relacionar el porcentaje de positivos con el origen de la muestra no es posible.

Se observaron 11 aislados que poseían un fenotipo positivo para la producción de biofilm en agar rojo Congo y negativos para la presencia de genes *ica*. El color negro de las colonias en este agar se debe a la presencia de polisacáridos que componen el biofilm de tipo PIA, que dependen de la expresión de los genes *ica*. Por lo que los genes deben estar presentes, pero no se obtuvo amplificación por la PCR. Esto pudo haber ocurrido por dificultades en la digestión de la pared celular, ya que el protocolo de PROMEGA® recomienda usar una mezcla de 60 µL de Lisozima (10 mg/mL) y 60 µL de Lisostafina (10 mg/mL) para una buena lisis de la pared celular. En esta investigación se utilizó 120 µL de Lisozima (10 mg/mL). Esto coincide con la baja concentración de ADN, medida en el NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™). Otra posibilidad pudo haber sido la fuerte presencia de biofilm en las colonias, esto pudo haber dificultado actividad enzimática de la Lisozima, de una manera similar en la que evade el contacto con los leucocitos en el cuerpo del hospedero (Arciola et al. 2018).

La presente investigación ha logrado comprobar que poblaciones de *S. aureus* y *S. epidermidis* provenientes de hospitales en Quito y el Puyo son capaces de producir biofilm de tipo PIA y los genes *ica* están presentes en un gran porcentaje de la población. En Kozitskaya et al. (2004) se

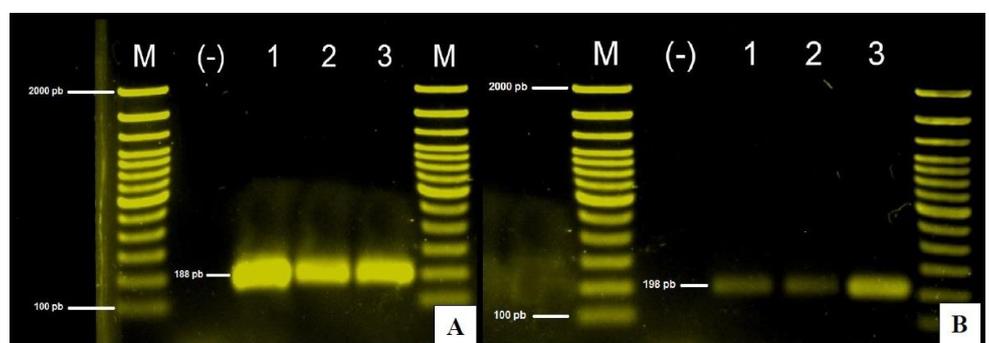


Figura 3. Geles representativos de los productos de amplificación obtenidos para los genes *ica* en *S. aureus*. **A)** *icaA* (188 pb), M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4584; aislado 2, CB-QCA 4751; aislado 3, CB-QCA 4583; **B)** *ica D* (198 pb), M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4584; aislado 2, CB-QCA 4751; aislado 3, CB-QCA 4583

Tabla 3. Producción o no producción de biofilm definido por pruebas cualitativa y PCR

Código PUCE	Identificación	Hospital	Genes asociados a la producción de Biofilm				Rojo Congo	Presencia
			<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>		
4524	<i>S. aureus</i>	H-Puyo	1 ^{SS}	sc	sc	1	cn	1 ^S
4540	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	0 ^{**}	0	0	0	n	1
4556	<i>S. aureus</i>	H-Puyo	1	sc	sc	1	r	0*
4566	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	0	0	0	0	ro	0
4569	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	r	0
4571	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	n	1
4574	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	r	0
4576	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	mr	0
4577	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	r	0
4583	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	r	0
4584	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4587	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4588	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	mr	0
4592	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	r	0
4598	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	r	0
4613	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	0	0	0	0	cn	1
4615	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	0	sc	sc	0	cn	1
4616	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	0	0	n	1
4620	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	0	1	mn	1
4629	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	r	0
4634	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	mr	0
4636	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	mn	1
4653	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	r	0
4655	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4656	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	mn	1
4659	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	mn	1
4681	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	0	0	mr	0
4682	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	mr	0
4695	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	mn	1
4696	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	0	1	r	0
4709	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	0	1	r	0
4710	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	n	1
4713	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	0	0	1	n	1
4714	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4718	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	mn	1
4721	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	0	0	0	0	r	0
4722	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	mr	0
4723	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4724	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	r	0
4728	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	r	0
4729	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	mr	0
4730	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	ro	0
4735	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	r	0
4736	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	ro	0
4747	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	r	0
4749	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4750	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	n	1
4784	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4798	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	n	1
4799	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	ro	0
4814	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	n	1
4827	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	r	0

Continuación Tabla 3. Producción o no producción de biofilm definido por pruebas cualitativa y PCR

Código PUCE	Identificación	Hospital	Genes asociados a la producción de Biofilm				Rojo Congo	Presencia
			<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>		
4828	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4838	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	n	1
4839	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	n	1
4843	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	0	r	0
4845	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4847	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	0	r	0
4857	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	mn	1
4858	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	r	0
4869	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	ro	0
4873	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	n	1
4874	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	mn	1
4875	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	r	0
4881	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	1	r	0
4888	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	mr	0
4889	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	ro	0
4891	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	n	1
4892	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	n	1
4899	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	ro	0
4901	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	0	0	0	0	mn	1
4902	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	0	0	0	0	r	0
4909	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	0	1	n	1
4911	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	r	0
4926	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	0	sc	sc	0	n	1
4927	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	mn	1
4929	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	0	1	r	0
4930	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	r	0
4931	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	0	sc	sc	0	ro	0
4943	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	0	1	r	0
4944	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	1	sc	sc	0	ro	0
4947	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	1	1	1	1	r	0
4949	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	r	0
4951	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	r	0
4960	<i>S. aureus</i>	H-Puyo	1	sc	sc	1	r	0
4965	<i>S. aureus</i>	H-Puyo	1	sc	sc	1	r	0
4973	<i>S. aureus</i>	H-Puyo	1	sc	sc	1	ro	0
4983	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	0	1	ro	0
4986	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	r	0
4989	<i>S. aureus</i>	H2-Quito	1	sc	sc	1	mr	0
4993	<i>S. aureus</i>	H1-Quito	0	sc	sc	0	ro	0
4998	<i>S. epidermidis</i>	H1-Quito	0	0	0	0	r	0
5001	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	1	1	1	1	mr	0
5002	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	ro	0
5003	<i>S. epidermidis</i>	H2-Quito	0	0	0	0	r	0
5018	<i>S. aureus</i>	H-Puyo	1	sc	sc	1	ro	0
5019	<i>S. aureus</i>	H-Puyo	1	sc	sc	1	ro	0
5020	<i>S. aureus</i>	H-Puyo	1	sc	sc	1	mr	0
5021	<i>S. aureus</i>	H-Puyo	1	sc	sc	1	ro	0
ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	-	0	sc	sc	1	n	1

*(0) ausencia de biofilm, ^S(1) presencia de biofilm; ***(0) ausencia del gen; ^S(1) presencia del gen; (ATCC) Colección Americana de Cultivos Tipo, en inglés American Type Culture Collection; (CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica; (cn) casi negro, (H1-Quito) Hospital 1 de Quito, (H2-Quito) Hospital 2 de Quito, (H-Puyo) Hospital del Puyo, (mn) muy negro, (mr) muy rojo, (n) negro, (r) rojo, (ro) rojo obscuro; (sc) sin cebadores, *Staphylococcus aureus* no cuenta con cebadores para *ica B* y *C*.

Tabla 4. Porcentaje de presencia de biofilm por prueba bioquímica y por PCR de *S. aureus* y *S. epidermidis*

Especie/# individuos	Presencia por bioquímica	Presencia por PCR	Gen <i>icaA</i>	Gen <i>icaB</i>	Gen <i>icaC</i>	Gen <i>icaD</i>
<i>S. aureus</i> (39)	20,51% (8/39)	89,74% (35/39)	87,18% (34/39)	-	-	87,18% (34/39)
<i>S. epidermidis</i> (61)	34,42% (21/61)	59,02% (36/61)	59,02% (36/61)	57,38% (35/61)	42,62% (26/61)	52,46% (32/61)

relaciona la presencia de los genes *icaADBC* con resistencias a antibióticos y a la presencia de múltiples copias del elemento móvil IS256 en cepas clínicas, sugiriendo que este conjunto de elementos proporciona una variabilidad que le brinda una ventaja frente a cambios ambientales presentes en un hospital. La OMS ha catalogado a *S. aureus* como prioridad 2: elevada, debido a su creciente farmacorresistencia, por lo que es necesario buscar nuevos antibióticos (OMS 2017) o alternativas para su tratamiento (Zapotoczna et al. 2016).

El estudio de biofilm en estafilococos dentro de Latinoamérica se concentra en Brasil. Silva (2014) encontró una incidencia del 48,00 % de cepas hospitalarias de *S. epidermidis* que presentaban los genes *ica*. En el estudio de Batistao et al. (2016) el 44,00 % de su población de *S. aureus* presentaban genes *ica*.

Dentro de Ecuador no existen estudios de biofilm en *S. aureus* y *S. epidermidis*. Pero existen estudios sobre los grupos clonales de *S. aureus* circulantes en el país con los cuales podemos relacionar la presencia de biofilm. Según Zurita et al. (2016) los clones de *S. aureus* USA300-LV y USA600 fueron encontrados en el país. Estos poseen una diversidad de cepas capaces de producir biofilm fuertes o débiles (King et al. 2016).

Conociendo los grupos clonales de *S. aureus* y su capacidad de producir biofilm presentes en el país, se podría esperar que existan varias resistencias a antibióticos transferidas entre *S. aureus* y *S. epidermidis*. Esto debido a que ambas bacterias suelen compartir nichos y el biofilm es un ambiente propicio que mejora la capacidad de transferencia horizontal de material genético (Savage et al. 2013; Haaber et al. 2017). La transferencia de resistencias a aminoglucósidos y a Linezolid entre *S. aureus* y *S. epidermidis* ha sido documentada en varios estudios (Haaber et al. 2017; Cafini et al. 2016), por lo que el crecimiento de *S. epidermidis* como un patógeno casual en hospitales es de esperarse.

Comprender el funcionamiento del locus *ica* nos puede brindar opiniones sobre tratamientos terapéuticos a seguir en caso de infecciones con bacterias productoras de biofilm, para lo que se suele recomendar remoción quirúrgica del implante infectado y administración de vancomicina en caso de ser resistente a la meticilina (MRSA) (Archer et al. 2011). McCarthy et al. (2015) al relacionar la producción de biofilm en aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y sensibles a la meticilina (MSSA), notaron que los aislados sensibles producían biofilm *ica*-dependiente, mientras que los resistentes formaban biofilm *ica*-independientes, indicando que cuando las bacterias adquieren la resistencia prefieren producir biofilm del tipo proteico (*ica*-independiente) al biofilm tipo polisacárido (*ica*-dependiente).

El estudio del biofilm de tipo PIA es un área que aún requiere de mucha investigación. Todavía se desconoce si los genes pueden ser transferidos horizontalmente (Kozitskaya et al. 2005) o de tratamientos efectivos. Para futuros proyectos se podría evaluar la relación de la producción de biofilm con resistencias a otro tipo de antibióticos como en Kozitskaya et al. (2004) dentro del país, ya que conocemos que existen cepas capaces de producir biofilm con resistencias a algunos antibióticos (Batistao et al. 2016). Existen estrategias terapéuticas que se encuentran en fase pre-clínica como péptidos antimicrobianos, bacteriófagos, enzimas degradantes de biofilm o bloqueadores de quorum sensing, pero aún no se logra alcanzar el objetivo al 100 %

(Otto 2019) por lo que la investigación debe continuar para prevenir las complicaciones en el tratamiento de infecciones hospitalarias asociadas a *S. aureus* o *S. epidermidis*.

Conclusiones

- Los aislados clínicos de *S. aureus* y *S. epidermidis* provenientes de procesos infecciosos de hospitales de tercer nivel de ciudades de Quito y el Puyo y tiene capacidad de producir biofilm.
- Se identificó que una tercera parte (29,00 %) de aislados de *S. aureus* y *S. epidermidis* son productores de biofilm mediante la prueba cualitativa en agar rojo Congo.
- Se identificó que la gran mayoría (71,00 %) de los aislados clínicos de *S. aureus* y *S. epidermidis* presentan los genes productores de biofilm expresando, incluyendo la cepa de referencia *S. aureus* ATCC® 25923.
- La identificación de la formación de biofilm mediante la prueba de rojo Congo no es precisa al identificar aislados clínicos de *S. aureus* y *S. epidermidis* capaces de producir biofilm ica-dependiente, pues la expresión de biofilm es muy variada, como se pudo evidenciar en los distintos fenotipos mostrados en rojo Congo.

Agradecimientos

Un cordial agradecimiento a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento a través de proyecto PUCE 2018 Código O13020 y desde el 2019 QINV0017-IINV529010100. También al Laboratorio de Microbiología de la escuela de Biología por la apertura y disponibilidad para el desarrollo de este trabajo de investigación. A todos los integrantes del laboratorio de Microbiología por el apoyo y la confianza depositada en el desarrollo del presente trabajo. Agradecemos profundamente a los directivos de las tres casas de salud quienes gentilmente donaron los aislados que se incluyeron en este estudio.

Declaración de conflicto de intereses y contribución de los autores

Los autores declaramos que no tenemos conflicto de intereses y nuestras contribuciones fueron las siguientes:

Andrés Sanguano: diseño experimental del estudio, adquisición y colección de datos, análisis e interpretación de datos, redacción de la versión inicial y final del manuscrito.

Iliana Alcocer: concepción y diseño del estudio, adquisición y colección de datos, redacción de la versión inicial del manuscrito, revisión del manuscrito y gestión de financiamiento.

María Fernanda Yauri: adquisición y colección de datos, concepción y diseño del estudio, análisis e interpretación de datos y revisión de la versión inicial del manuscrito.

Referencias bibliográficas

- Archer N, Mazaitis M, Costerton J, Leid J, Powers M, Shirtliff M. 2011. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2(5): 445-459.
- Arciola C, Baldassarri L, Montanaro L. 2001. Presence of icaA and icaD Genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(6): 2151-2156.
- Arciola C, Campoccia D, Montanaro L. 2018. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology*. 16(7): 397.
- Arciola C, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. 2002. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in Staphylococcus epidermidis clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials*. 23(21): 4233-4239.
- Arciola C, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 5(7): 1-10.

- Arciola C, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L. 2005. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of ica locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis associated infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 75(2): 408-413.
- Batistao D, Amaral de Campos P, Camilo N, Royer S, Araújo B, Naves K, Martins M, Pereira M, Henriques M, Gontijo-Filho P, Botelho C, Oliveira R, Ribas R. 2016. Biofilm formation of Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. *Journal of Medical Microbiology*. 65(4): 286-297.
- Cafini F, Nguyen L, Higashide M, Román F, Prieto J, Morikawa K. 2016. Horizontal gene transmission of the cfr gene to MRSA and Enterococcus: role of *Staphylococcus epidermidis* as a reservoir and alternative pathway for the spread of linezolid resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71(3): 587-592.
- Calà C, Amodio E, Di Carlo E, Virruso R, Fasciana T, Giammanco A. 2015. Biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* strains, isolated from the skin of hospitalized patients: genetic and phenotypic characteristics. *New Microbiol*. 38(4): 521-9.
- Carr A, Daley M, Givens Merkel K, Rose D. 2018. Clinical Utility of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Screening for Antimicrobial Stewardship: A Review of Current Literature. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 38(12): 1216-1228.
- Cavallini R. 2005. *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. [Internet]. San José (CR). Editorial Universidad de Costa Rica. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&printsec=frontcover&dq=Rodr%C3%ADguez+E,+Gamboa+M,+Hern%C3%A1ndez+F,+Garc%C3%ADa+J.+2006.+Bacteriolog%C3%ADa+general:+Principios+y+pr%C3%A1cticas+de+laboratorio.+Costa+Rica:+Editorial+Universidad+de+Costa+Rica.&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjvXrLmz6HtAhV4SzABHesvAb0Q6AEwAXoECAIQAg#v=onepage&q&f=false>
- Conlon K, Humphreys H, O'Gara J. 2002. icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*. 184(16): 4400-4408.
- Dong Y, Speer C, Glaser K. 2018. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence*. 9(1): 621-633.
- Van Duijkeren E, Schink A, Roberts M, Wang Y, Schwarz S. 2018. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*: 51-82.
- Freeman D, Falkiner F, Keane C. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 42(8): 872-874.
- Granslo H. 2012. *Staphylococcus epidermidis*-virulence factors and innate immune response [thesis]. [Tromsø, (NO)]. Universidad de Tromsø.
- Haaber J, Penadés J, Ingmer H. 2017. Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*. 25(11): 893-905.
- Haddad O, Merghni A, Elargoubi A, Rhim H, Kadri Y, Mastouri M. 2018. Comparative study of virulence factors among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *BioMed Central Infectious Diseases*. 18(1): 560.

- Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. 2019. Are coagulase-negative staphylococci virulent?. *Clinical Microbiology and Infection*. 25(9): 1071-1080.
- Hennig S, Ziebuhr W. 2008. A transposase-independent mechanism gives rise to precise excision of IS256 from insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*. 190(4): 1488-1490.
- Jaškiewicz M, Janczura A, Nowicka J, Kamysz W. 2019. Methods Used for the Eradication of Staphylococcal Biofilms. *Antibiotics*. 8(4): 174.
- Ji Y, editor. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols. Volumen 1. New Jersey: Humana Press.
- Kaiser T, Pereira E, dos Santos K, Maciel E, Schuenck R, Nunes A. 2013. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 75(3): 235-239.
- King J, Kulhankova K, Stach C, Vu B, Salgado-Pabón W. 2016. Phenotypes and virulence among *Staphylococcus aureus* USA100, USA200, USA300, USA400, and USA600 clonal lineages. *mSphere*. 1(3).
- Kleinschmidt S, Huygens F, Faoagali J, Rathnayake I, Hafner L. 2015. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiology*. 10(11): 1859-1879.
- Knobloch J, Horstkotte M, Rohde H, Mack D. 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical microbiology and immunology*. 191(2): 101-106.
- Knobloch K, Von Osten H, Horstkotte M, Rohde H, Mack D. 2008. Biofilm formation is not necessary for development of quinolone-resistant "persister" cells in an attached *Staphylococcus epidermidis* population. *The International Journal of Artificial Organs*. 31(9): 752-760.
- Koneman E, Allen S. 2008. Koneman. *Diagnostico Microbiologico: Texto y Atlas en Color*. Sexta edición. Buenos Aires(ARG): Editorial Médica Panamericana S.A.
- Kozitskaya S, Cho S, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. 2004. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infection and immunity*. 72(2): 1210-1215.
- Kozitskaya S, Olson M, Fey P, Witte W, Ohlsen K, Ziebuhr W. 2005. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*. 43(9): 4751-4757.
- Lee J, Bae Y, Han A, Lee S. 2016. Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 73: 707-714.
- Lim S, Lee D, Kwak W, Shin H, Ku H, Lee J, Lee G, Kim H, Choi S, Ryu S, Lee J. 2015. Comparative genomic analysis of *Staphylococcus aureus* FORC_001 and *S. aureus* MRSA252 reveals the characteristics of antibiotic resistance and virulence factors for human infection. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(1): 98-108.
- Luther M, Bilida S, Mermel L, LaPlante K. 2015. Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infectious diseases and therapy*. 4(2): 219-226.
- McCarthy H, Rudkin J, Black N, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara J. 2015. Methicillin resistance and

the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 5(1): 1-9.

Mirzaee M, Najar Peerayeh S, Ghasemian A. 2014. Detection of icaABCD genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pathology*. 9(4): 257-262.

O'Gara J. 2007. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 270(2): 179-188.

Oliveira W, Silva P, Silva R, Silva G, Machado G, Coelho L, Correia M. 2018. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *Journal of Hospital Infection*. 98(2): 111-117.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. Comunicado de Prensa de la OMS; [citado 2020 Feb 5]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>

Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7(8): 555.

Otto M. 2019. Staphylococcal biofilms. *Gram Positive Pathogens*: 699-711.

Pahissa A. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. [Internet]. Barcelona (ESP). Marge Books. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=qFRukXHQX6QC&pg=PA6&dq=Pahissa+A.+2009.+Infecciones+producidas+por+Staphylococcus+aureus.+Barcelona,+Espa%C3%B1a,+Marge+Books.&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjftcPyzqHtAhVRVTABHbjOB-gQ6AEwAHoECAUQA#v=onepage&q=Pahissa%20A.%202009.%20Infecciones%20producidas%20por%20Staphylococcus%20aureus.%20Barcelona%2C%20Espa%C3%B1a%2C%20Marge%20Books.&f=false>

Paluch-Oleś J, Magryś A, Koziol-Montewka M, Niedzielski A, Niedźwiadek J, Niedzielska G, Kotowski M. 2011. The phenotypic and genetic biofilm formation characteristics of coagulase-negative staphylococci isolates in children with otitis media. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 75(1): 126-130.

Petrelli D, Zampaloni C, d'Ercole S, Prenna M, Ballarini P, Ripa S, Vitali L. 2006. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 25(12): 773-781.

Rohde H, Knobloch J, Horstkotte M, Mack D. 2001. Correlation of *Staphylococcus aureus* icaADBC genotype and biofilm expression phenotype. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(12): 4595-4596.

Ruano C, Maldonado J, Salazar R. 2004. Frecuencia de infección nosocomial en terapia intensiva: datos del proyecto PIN-FCM. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 42(1)

Santos A, Galdino A, Mello T, Ramos L, Branquinha M, Bolognese A, Neto J y Roudbary M. 2018. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 113(9).

Savage V, Chopra I, O'Neill A. 2013. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 57(4): 1968-1970.

Silva Filho R. 2014. Produção de biofilme em amostras clínicas de *S. epidermidis*: influência de

concentrações subinibitórias de antissépticos (etanol e clorexidina) e associação com potenciais marcadores de virulência (Disertación Doctoral). [Rio de Janeiro (BR)]: Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Recuperado de: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/10997>

Solati S, Tajbakhsh E, Khamesipour F, Gugnani H. 2015. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. *Applied Microbiology Express*. 5(1): 47.

Tango C, Akkermans S, Hussain M, Khan I, Van Impe J, Jin Y, Oh D. 2018. Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Food microbiology*. 76: 287-295.

Traisaeng S, Herr D, Kao H, Chuang T, Huang C. 2019. A derivative of butyric acid, the fermentation metabolite of *Staphylococcus epidermidis*, inhibits the growth of a *Staphylococcus aureus* strain isolated from atopic dermatitis patients. *Toxins*. 11(6): 311.

Zapotoczna M, O'Neill E, O'Gara J. 2016. Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS pathogens*. 12(7): e1005671.

Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Löbner I, Götz F, Hacker J. 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular Microbiology*. 32(2): 345-356.

Zurita J, Barba P, Ortega-Paredes D, Mora M, Rivadeneira S. 2016. Local circulating clones of *Staphylococcus aureus* in Ecuador. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 20(6): 525-533.

NOTAS CIENTÍFICAS

First record of *Phlegmariurus pruinosus* (Herter) B. Øllg. (Lycopodiaceae) for Ecuador from the Cordillera del Cóndor range

Primer registro de *Phlegmariurus pruinosus* (Herter) B. Øllg. (Lycopodiaceae) para el Ecuador en la Cordillera del Cóndor

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen 42. No. 1, Mayo 2021

Álvaro J. Pérez^{1*}, Nicolás Zapata¹, Daniela Cevallos², Claes Persson³, Edison Rea¹, Benjamin Øllgaard⁴

¹Herbario QCA, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Ecuador, Av. 12 de Octubre 1076 y Roca, Apartado 17-01-2184, Quito, Ecuador.

²Grupo de Investigación en Biodiversidad, Medio Ambiente y Salud (BIOMAS), Universidad de las Américas (UDLA), Vía Nayón s/n, Quito, Ecuador.

³Department of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg, P.O. Box 461, 40530 Göteborg, Sweden.

⁴Herbarium AAU, Science Museums, and Section for Ecoinformatics and Biodiversity, Department of Biology, Building 1137, University of Aarhus, DK-8000 Aarhus, Denmark.

*Autor de correspondencia:
ajperezc@puce.edu.ec

Recibido 1-02-2021
Aceptado 7-04-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i1.887

e-ISSN 2477-9148

© 2021. Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia CC BY 4.0

Como citar este artículo:
Pérez AJ, Zapata N, Cevallos D, Persson C, Rea E, Øllgaard B. 2021. First record of *Phlegmariurus pruinosus* (Herter) B. Øllg. (Lycopodiaceae) for Ecuador from the Cordillera del Cóndor range. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 42(1): 57-62. doi: 10.26807/remcb.v42i1.887

Abstract.- During a recent botanical exploration in El Quimi Biological Reserve (Cordillera del Cóndor), Morona-Santiago province, we found for the first time in Ecuador *Phlegmariurus pruinosus* (Herter) B. Øllg., a species previously recorded as endemic from Peru. We present a morphological description, photographs, and an updated distribution map. Additionally, we highlight the morphological differences with *Phlegmariurus campianus* (B. Øllg.) B. Øllg., a similar species from Colombia, Ecuador, and Peru. A total of 67 species of *Phlegmariurus* are recorded for Ecuador..

Keywords: Conservation, Cordillera del Cóndor, Distribution range, El Quimi Biological Reserve, Lycophytes, Morona-Santiago, Taxonomy.

Resumen.- Durante una reciente expedición botánica a la Reserva Biológica El Quimi (Cordillera del Cóndor), provincia de Morona Santiago, registramos por primera vez para el Ecuador a *Phlegmariurus pruinosus* (Herter) B. Øllg., una especie considerada como endémica del Perú. Se presenta una descripción morfológica, fotografías y un mapa de distribución actualizado. Adicionalmente, se resaltan las diferencias morfológicas con *Phlegmariurus campianus* (B. Øllg.) B. Øllg., una especie similar de Colombia, Ecuador y Perú. Un total de 67 especies de *Phlegmariurus* están registradas para el Ecuador.

Palabras clave: Conservación, Cordillera del Cóndor, Licofitas, Morona Santiago, Rango de distribución, Reserva Biológica El Quimi, Taxonomía.

Introduction

The Neotropical clade of *Phlegmariurus* Holub is the most morphologically and ecologically diverse lineage within the Lycopodiaceae P. Beauv. ex Mirb., comprising approximately 170 species that occupy a broad array of epiphytic and terrestrial habitats (Field et al. 2016). Recent studies suggest that the high diversity of this group is related to the uplift of the Andes mountain range (Wikström and Kenrick 2001, Testo et al. 2018, 2019).

Taxonomic studies of Ecuadorian Lycopodiaceae have registered the occurrence of 85 species (Øllgaard 1988, 2016, 2019), of which *Phlegmariurus* is the most diverse genus with 67 species, including this new record.

The Cordillera del Cóndor is a poorly explored region that extends ca. 150 km in a north-south direction from Ecuador to Peru, and is considered a five million year old eastern extension of the Andean chain (Gregory-Wodzicki 2000). Biological exploration in this area has revealed a high concentration of species new to science as well as high endemism, and many species are still to be discovered. This mountain range is isolated from the main Andean range and is geologically distinct, formed with an intermixture of limestone, quartzitic sandstone, and igneous rock of the

Hollín Formation (Gregory-Wodzicki 2000, Neill 2005). The geology of these mountains is similar to the tepuis of the Guyana shield in northwest South America. In fact, a number of angiosperm genera once thought to be endemic to the tepuis of the Guyana shield have also been found along the Cordillera del Cóndor (Berry et al. 1995, Schulenberg & Awbrey 1997).

The most recent botanical exploration to El Quimi Reserve took place in January 2019 and was led by scientists from the Herbarium of the Pontifical Catholic University of Ecuador (QCA) with support from the University of Gothenburg Herbarium (GB). This exploration resulted in the first record of *Phlegmariurus pruinus* (Herter) B. Øllg., among others (Gradstein et al. 2019, Mashburn et al. 2020, Pérez et al. 2020). This lycophyte species was previously recorded as an endemic, and only known from four localities along central and northern Peru. In this paper, we present a morphological description, photographs and a distribution map for this species. Additionally, we highlight the morphological differences with *Phlegmariurus campianus* (B. Øllg.) B. Øllg., a morphologically similar species from Colombia, Ecuador and Peru.

Methods

We made a floristic inventory in the Andean tepui of the El Quimi Biological Reserve during January 2019. The plateau of El Quimi is one of the highest quartzitic sandstone plateaus of the Hollín Formation, which is the geological foundation of the Cordillera del Cóndor in Ecuador. The plateau rises 2000 to 2200 m elevation and is located in southeastern Morona-Santiago Province, near the Ecuador-Peru border (Gradstein et al. 2019, Mashburn et al. 2020, Pérez et al. 2020).

Collected specimens were deposited in the QCA herbarium. Dry material and pictures of our specimens were the basis to update the morphological description of *Phlegmariurus pruinus* (Øllgaard 1994). All measurements were made on dry material, fine observations and measurements of reproductive structures were made with the aid of a dissecting microscope. Major characters were contrasted with a morphologically similar species. The identification was made by consulting pertinent literature, specimens examined at relevant herbaria (AAU, B, MO, QCA, QCNE, S, UC, US) and high-resolution images of the type material of Neotropical taxa (Tropicos database, <https://www.tropicos.org/> and the JSTOR Global Plants website <http://plants.jstor.org>) and the Pteridoportal website (www.Pteridoportal.org).

Results

Phlegmariurus pruinus (Herter) B. Øllg. Phytotaxa 57: 18. 2012

Lycopodium pruinusum Hieron. et Herter ex Herter, Bot. Jahrb. Syst. 43, Beibl. 98: 52. 1909. — *Urostachys pruinus* (Herter) Nessel, Arch. Bot. São Paulo 1: 420. 1927. — *Huperzia pruinosa* (Herter) Holub, Folia Geobot. Phytotax. 20: 76. 1985. — TYPE: Peru, Dept. Amazonas, Prov. Chachapoyas, Tambo Ventillas, 2400–2600 m, 28 Jul. 1904. Weberbauer (err. as Ule in protologue) 4410 (holotype B!, 20 0113758; isotypes BONN, Herb. Nessel 621!, G!, US 1187611!).

Lycopodium durissimum Herter, Bot. Jahrb. Syst. 43, Beibl. 98: 52. 1909. — *Urostachys durissimum* (Herter) Nessel, Bärlappgewächse 240. 1939. — *Huperzia durissima* (Herter) Holub, Folia Geobot. Phytotax. 20: 72. 1985. — TYPE: Peru, »Voyage à l'Equateur et au Perou, 1876-77, Guayab. a mars 1877« (err. »Colombia, Guayabal« in protologue), Vidal-Sénèze [Senège] s.n. (holotype P!; isotype BONN, Herb. Nessel 622!).

Plants erect to scandent and distally recurved, unbranched or sparsely branched at base, distally with densely tassel like ramification, at least up to 170 cm long. Shoots heterophyllous, the basal divisions with expanded leaves ca. 10–18 mm in diameter including leaves, distally abruptly constricted to ca. 2–2.5 mm including the reduced, imbricate leaves. Stems excluding leaves up to 5 mm thick at the base, upward tapering to ca. 0.5–1.5 cm, rigid, dark brown to purplish brown. Expanded leaves of basal divisions borne in alternating, irregular, distant whorls of 4, the whorls 6–10 mm apart, ascending to spreading or sharply reflexed, lanceolate, straight or recurved, (6–) 8–12 mm long, 2.5–4 mm wide, acute, flat, coriaceous, with smooth, revolute margins, often adaxially concave. Leaves of recurved, constricted divisions subdecussate, densely crowded, sporangiate almost throughout, imbricate, widely ovate with obtuse to acute apex, abaxially

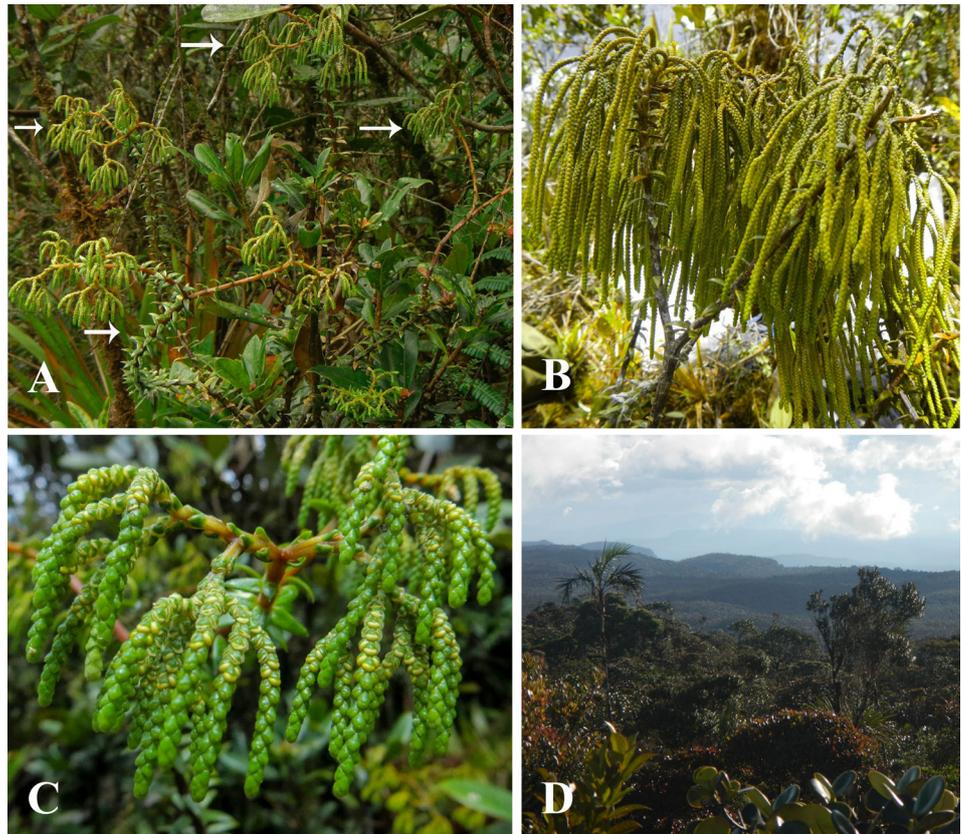


Figura 1. *Phlegmariurus pruinosus*. A) Habit, arrows shows the stem with vegetative leaves and the terminal sporophylls arrangement. B) Isotomous branching pattern with sporangia at the apex. C) Sporophylls and sporangia detail. D) Habitat in El Quimi Biological Reserve. Photos taken by: A, B, C by Nicolas Zapata, D by Álvaro J. Pérez.

rounded to carinate, 1.2–1.6 mm long and wide, equaling or slightly exceeding the sporangia. Sporangia 1–1.3 mm wide.

Distribution, habitat and ecology. Until this new record from the Cordillera del Cóndor, in El Quimi Biological Reserve, Morona-Santiago province in Ecuador, this species was considered an endemic and only known from four localities in Peru, the holotype, which was collected in 1904 in Chachapoyas, and from Oxapampa and San Martín (Figure 2). The new locality is a broad plateau with quartzitic sandstones of the Hollín Formation, referred to in recent literature as an Andean tepui (Neill et al. 2014). This is in reference to its similarity with the tepuis of the Guiana Shield (Huber 1995). The habitat is an open tepui-like bromeliad sward and elfin forest at 1900–2200 m (Figure 1D). According to the Ministerio del Ambiente de Ecuador (2013), this locality lies within a much larger zone dominated by evergreen mountain forest of sandstone plains of Cordillera del Cóndor (bosque siempreverde montano sobre mesetas de arenisca de la Cordillera del Cóndor, BsMa01).

Examined specimens. ECUADOR. Morona-Santiago: Gualaquiza Cantón, Parroquia Bomboiza, Reserva Biológica El Quimi, sendero y alrededores entre el campamento Río Cristalino y la frontera con Perú, 03°31'05"S, 78°23'28"W, 1900–2200 m, 22 Jan. 2019, Pérez et al. 11335 (QCA), Zapata et al. 524, 525 (QCA); Colecciones en el sendero entre el cerro JJ y el campamento Río Cristalino, 03°31'01"S, 78°24'15"W, 2000 m, 26 Jan. 2019, Pérez et al. 11505 (QCA), Zapata et al. 565 (QCA), Persson et al. 3245 (GB).

Additional examined specimens. PERU. Amazonas: Chachapoyas, Remnants of forest around

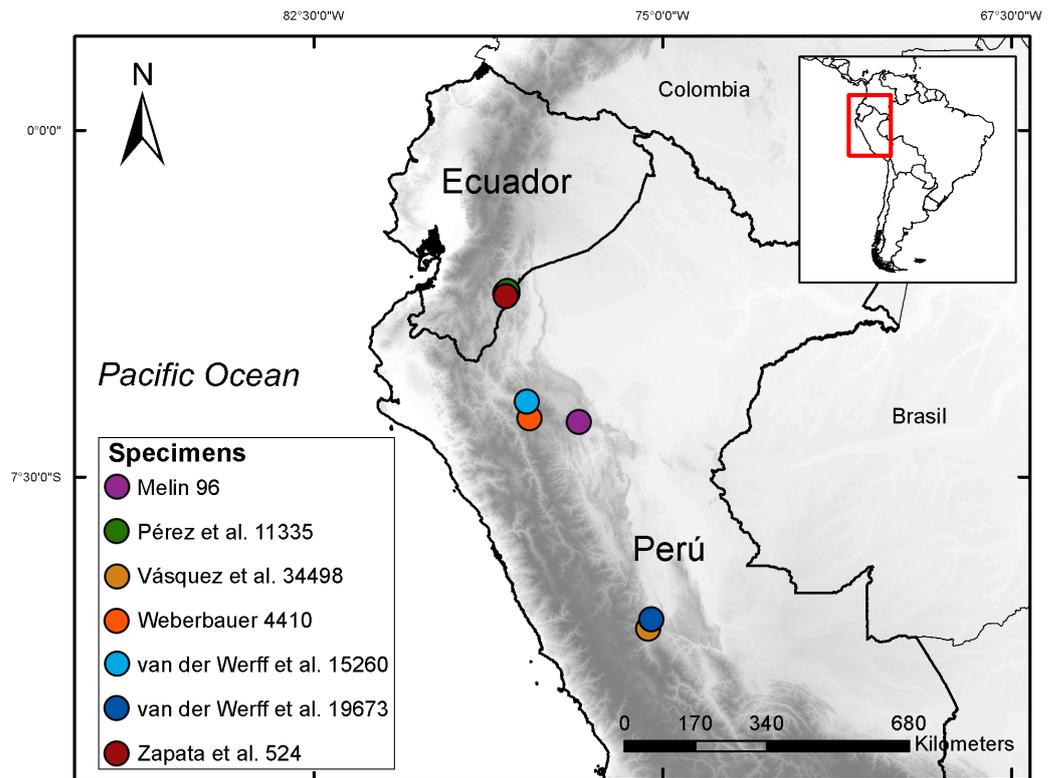


Figure 2. Distribution map of *Phlegmarius pruinus*.

Laguna Pomacocha, partly on white sand, partly on fertile soil, 5°50'11"S, 77°57'47"W, 2250 m, 20 Mar. 1998, van der Werff et al. 15260 (MO 1742421, UC 1728965). Pasco: Oxapampa, From Antenas past Chaco to the Laguna. Scrub on sandstone-derived soils, 10°37'11"S, 75°17'16"W, 2700–2800 m, 5 May 2005, van der Werff et al. 19673 (MO 1742418, UC 1872823); Zona de Amortiguamiento del Parque Nacional Yanachaga-Chemillén, Sector Chacos, 10°39'20"S, 75°17'50"W, 2500–2790 m, 10 Oct. 2008, Vásquez et al. 34498 (MO 2646897, UC 2045629). San Martín: Mount Organero, ceja, 1900 m, 14 Aug. 1925, Melin 96 (S 17-13440).

Discussion

The morphological variation of the *Phlegmarius pruinus* population found in the El Quimi Reserve matches with the description for this species (Øllgaard 1994), except for the size of the plant, that is longer and reach up to 170 cm. *Phlegmarius pruinus* is morphologically similar to *Phlegmarius campianus* (B. Øllg.) B. Øllg., a species that occurs from 2400 to 3800 m of elevation in Colombia, Ecuador and Peru. *Phlegmarius pruinus* can be recognized mainly by its erect to scandent, terrestrial habit (vs. pendulous epiphytes in *P. campianus*), expanded leaves of proximal divisions in distant, alternating whorls of 4 (vs. expanded leaves of proximal divisions in usually densely crowded, alternating whorls of 3 in *P. campianus*), the whorls 6–9 mm apart (vs. the whorls 2.5–5 mm apart in *P. campianus*) and sporangiate leaves of 1.2–1.6 mm long (vs. sporangiate leaves of 2–3 mm long in *P. campianus*) (Øllgaard 1994, 2019).

Phlegmarius pruinus can be considered a rare species because of its restricted and isolated distribution and the low number of collections available at herbaria, but more exploration effort is needed in order to know the real distribution. Currently, *P. pruinus* is known from southern Ecuador along the Cordillera del Cóndor and in central and northern Peru along the eastern foothills of the Andes, growing in cloud forest at 1900–2800 m (Figure 2). In Peru, this species grows in very humid environments and under a thick organic matter covered by bryophytes; while in the new locality, an Andean tepui at the Cordillera del Cóndor in Ecuador, *P. pruinus* is more abundant in open areas, dominated by terrestrial bromeliads and scattered shrubs. Here, initially it begins to grow erect and then abducts through the vegetation until it reaches more

than 150 cm long, then it emerges as a scandent in the vegetation developing the narrow sporangiate divisions.

We predict that new populations of this species as well as new species to science will be found in future explorations of the plateaus of the Cordillera del Cóndor in Ecuador and Peru. Nevertheless, the biodiversity of this area is severely threatened due to deforestation and mining activities (Mazabanda et al. 2018, Piotrowski & Ortiz 2019), thus the conservation of this highly biodiverse area is of utmost importance.

Acknowledgements

Fieldwork was granted by the Ministry of the Environment of Ecuador (003-2019-ICFLO-DNB/MAE). AJP, NZ, and CP express their gratitude to Patricio Paucar (Director of El Quimi Reserve), Juan Carlos Fernandez (Park ranger of El Quimi Reserve) and the Valle del Quimi community for their support during the fieldwork. To Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República del Ecuador for financial support (SENESCYT, Arca de Noé Initiative, S. R. Ron and O. Torres–Carvajal, Principal Investigators). Curators of cited herbaria allowed us to review the material. Finally, we thank the editors and two anonymous reviewers for their valuable suggestions that improved this paper.

Declaration of interest and Authors' Contributions

All authors declare that there is no conflict of interest. AJP, NZ and CP collected and photographed the plants. BO, NZ and DC identified the specimens. AJP, NZ, DC and ER wrote the text and revised herbarium collections. The field work was funded by the Arca de Noe project and the Herbarium GB.

References

- Berry PE, Huber O, Holst BK. 1995. Phytogeography of the Guayana Region. (Steyermark JA, Berry PE, Holst BK (eds) *Flora of the Venezuelan Guayana: volumen 1*). Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Field AR, Testo W, Bostock P, Waycott M. 2016. Molecular phylogenetics and the morphology of the Lycopodiaceae subfamily Huperzioidae supports three genera: *Huperzia*, *Phlegmariurus* and *Phylloglossum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 635–657.
- Gradstein SR, Reeb C, Persson C, Zapata N, Pérez ÁJ. 2019. *Riccardia verticillata* Gradst. & Reeb, a new dendroid species of *Riccardia* (Aneuraceae) from the Cordillera del Cóndor, Ecuador. *Journal of Bryology* 41(4): 322–327.
- Gregory-Wodzicki KM. 2000. Uplift history of the central and northern Andes: a review. *Geological Society of America Bulletin* 112: 1091–1105.
- Huber O. 1995. Geographical and physical features. In: Berry PE, Holst BK, Yatskievych K, editors. *Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 1: Introduction*. Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri. p. 1–62.
- Mazabanda C, Kemper R, Thieme A, Hettler B, Finer M. 2018. Impacts of mining project “Mirador” in the Ecuadorian Amazon. [Internet]. [accessed 2021 Mar 31]. <https://maaproject.org/mirador-ecuador/>
- Mashburn B, Pérez ÁJ, Persson C, Zapata N, Cevallos D, Muchhala N. 2020. *Burmeistera quimiensis* (Lobelioideae, Campanulaceae): A new species from the Cordillera del Cóndor range in southeast Ecuador. *Phytotaxa* 433(1): 67–74.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2013. Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. Subsecretaría de Patrimonio Natural, Quito.
- Neill DA. 2005. Cordillera del Cóndor: botanical treasures between the Andes and the Amazon. *Plant Talk* 41: 17–21.

- Neill DA, Rios Paredes M, Torres Montenegro LA, Mori Vargas TJ, Vriesendorp C. 2014. Vegetación y Flora/Vegetation and flora. In: Pitman N, Vriesendorp C, Alvira D, Markel JA, Johnston M, Ruelas Inzunza E, Lancha Pizango A, Sarmiento Valenzuela G, Álvarez-Loayza P, Homan J, Wachter T, del Campo Á, Stotz DF, Heilpern S, editors. Peru: Cordillera Escalera-Loreto. Rapid Biological and Social Inventories Report 26. The Field Museum, Chicago. p. 98–119.
- Øllgaard B. 1988. Lycopodiaceae. In: Harling G, Andersson L, editors. Flora of Ecuador 33. Gothenburg. p. 1–156.
- Øllgaard B. 1994. Family 26: Lycopodiaceae. In: Tryon RM, Stolze RG, editors. Pteridophyta of Peru VI. Fieldiana Botany 34, Chicago. p. 16–66.
- Øllgaard B. 2016. Additions, deletions and changes to the Ecuadorian Lycopodiaceae. *Phytotaxa* 246(2): 93–106.
- Øllgaard B. 2019. Synopsis of genus *Phlegmariurus* (Lycopodiaceae) in Colombia. *Phytotaxa* 426(1): 1–105.
- Pérez ÁJ, Persson C, Zapata N, Mashburn B, Vázquez-García JA. 2020. *Magnolia lozanoi* (*Magnolia* subsect. *Dugandiodendron*, Magnoliaceae) rediscovered on Ecuadorian “tepui” in Reserva Biológica El Quimi, Cordillera del Cóndor: Critically endangered by open-pit mining. *Phytotaxa* 428: 255–262.
- Piotrowski M, Ortiz E. 2019. Nearing the Tipping Point: Drivers of Deforestation in the Amazon Region. [Internet]. [accessed 2021 Mar 31]. <https://www.thedialogue.org/analysis/nearing-the-tipping-point-drivers-of-deforestation-in-the-amazon-region/>
- Schulenberg TS, Awbrey K. 1997. The Cordillera del Cóndor region of Ecuador and Peru: a biological assessment. RAP Working Papers 7. Conservation International, Washington, DC.
- Testo W, Øllgaard B, Field A, Almeida T, Kessler M, Barrington DS. 2018. Phylogenetic systematics, morphological evolution, and natural groups in neotropical *Phlegmariurus* (Lycopodiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 125: 1–13.
- Testo W, Sessa E, Barrington DS. 2019. The rise of the Andes promoted rapid diversification in Neotropical *Phlegmariurus* (Lycopodiaceae). *New Phytologist* 222(1): 604–613.
- Wikström N, Kenrick P. 2001. Evolution of Lycopodiaceae (Lycopsidea): Estimating divergence times from *rbcL* gene sequences by use of nonparametric rate smoothing. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 177–186.

Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia EnterobacteriaceaeMolecular characterization of β -lactam resistance genes in clinical bacterial isolates of the Enterobacteriaceae family

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen 42. No. 1, Mayo 2021

Duncan Coral¹, María Fernanda Yauri^{1*} e Iliana Alcocer¹

¹Laboratorio de Microbiología, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

*Autor de correspondencia:
mfyaurib@puce.edu.ec

Recibido 8-01-2021
Aceptado 17-04-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i1.886

e-ISSN 2477-9148

© 2021. Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia CC BY 4.0

Como citar este artículo:
Coral D, Yauri MF, Alcocer I. 2021. Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 42(1): 63-77. doi: 10.26807/remcb.v42i1.886

Resumen.- Las infecciones desarrolladas por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se relacionan con altas tasas de mortalidad y morbilidad en ambientes hospitalarios, gracias a su capacidad de hidrolizar antibióticos β -lactámicos. El objetivo del presente estudio fue caracterizar los genes que confieren resistencia a β -lactámicos en enterobacterias obtenidas de un hospital de tercer nivel de la ciudad de Quito. Se colectaron 153 enterobacterias y se identificó la especie mediante pruebas bioquímicas establecidas. El estudio seleccionó los aislados que presentaron producción de enzimas BLEE analizado por el método de sinergia de doble disco y el sistema automatizado VITEK 2 proporcionado en el hospital. De los 22 aislados seleccionados, 19 fueron identificados como *Escherichia coli* y 3 como *Klebsiella oxytoca*. La identificación de genes de resistencia empleó reacción en cadena de la polimerasa y usó cebadores específicos de cada gen codificante de BLEE ($bla_{CTX-M'}$, $bla_{TEM'}$, bla_{SHV}) y de enzimas carbapenemasas ($bla_{KPC'}$, bla_{IMP} , $bla_{VIM'}$, $bla_{NDM'}$). La identificación de la variante alélica reportó que 11/22 aislados presentaron el gen $bla_{CTX-M-15}$ y 4/22 el gen bla_{TEM-1} . Ninguno aislado presentó genes de resistencia a carbapenémicos. La tipificación molecular se realizó con electroforesis en Gel de Campo Pulsado y mostró ausencia de diseminación clonal.

Palabras clave: β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enterobacterias, genes de resistencia, resistencia bacteriana, variante alélica.

Abstract.- Infections developed by extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL) are associated with high mortality and morbidity rates in hospital settings due to their ability to hydrolyze β -lactam antibiotics. The objective of this study was to characterize the genes that confer resistance to β -lactams in Enterobacteriaceae obtained from a tertiary hospital in the city of Quito. 153 members of the Enterobacteriaceae were collected and the species was identified with biochemical tests. The study selected the isolates that presented ESBL enzyme production analyzed by the double disk synergy method and the VITEK 2 automated system provided by the hospital. Of the 22 selected isolates, 19 were identified as *Escherichia coli* and 3 as *Klebsiella oxytoca*. The identification of resistance genes used a polymerase chain reaction and used specific primers for each gene encoding ESBL ($bla_{CTX-M'}$, $bla_{TEM'}$, bla_{SHV}) and carbapenemase enzymes ($bla_{KPC'}$, bla_{IMP} , $bla_{VIM'}$, $bla_{NDM'}$). The identification of the allelic variant reported that 11/22 isolates presented the $bla_{CTX-M-15}$ gene and 4/22 the bla_{TEM-1} gene. None of the isolates presented genes for resistance to carbapenems. Molecular typing was performed with Pulsed Field Gel Electrophoresis and showed the absence of clonal spread.

Keywords: allelic variant, bacterial resistance, Enterobacteriaceae, extended spectrum betalactamasas (ESBL), resistance genes.

Introducción

La familia Enterobacteriaceae comprende más de 30 géneros y alrededor de 100 especies bacterianas. Los miembros de esta familia son bacterias Gram negativas, de forma bacilar y están presentes en el intestino de humanos y otros animales homeotermos formando parte de la microbiota natural (CDC 2013). Esta familia alberga géneros de importancia clínica como: *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella* y *Citrobacter*. Las especies patógenas producen infecciones oportunistas, en especial a pacientes hospitalizados con sistemas inmunitarios comprometidos como pacientes con VIH, pacientes oncológicos, niños y ancianos (Adeolu et al. 2016).

En la actualidad, la eficacia de estos agentes se ha reducido por el desarrollo de diversos mecanismos de resistencia por parte de la bacteria. Así tenemos: 1) producción de enzimas tipo β -lactamasas que inactivan los antibióticos por hidrólisis; 2) modificación del sitio blanco de acción, disminuyendo la afinidad de unión del antibiótico a la bacteria; 3) cierre de canales porinas, disminuyendo la permeabilidad de la célula bacteriana al antibiótico, y 4) bombas activas que extraen el antibiótico desde el interior de la célula al exterior (Zeng y Lin 2013, Cho et al. 2014, Shaikh et al. 2015).

Las β -lactamasas son enzimas producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas. En este grupo se encuentran las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas codificadas por genes cromosómicos y plasmidiales. Estas enzimas comprenden β -lactamasas tipo SHV, TEM, CTX-M, Amp-C y PER (D'Andrea et al. 2013, López et al. 2016).

Entre las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), el tipo CTX-M es el grupo de mayor importancia clínica en la actualidad. La mayoría de estudios que involucran bacterias productoras de BLEE lo reportan (Brolund y Sandegren 2016). El grupo CTX-M fue descrito por primera vez a partir de un aislado de *Escherichia coli* en el año 1989 en Munich, Alemania. Debe su nombre a la capacidad de producir la enzima cefotaximasa, enzima que confiere resistencia a la cefotaxima (Cantón et al. 2012). Se originó a partir de genes cromosomales presentes en miembros del género *Kluyvera*. Este género de bacterias comprende varias especies ambientales y no suelen estar relacionadas a reportes clínicos (Rossolini et al. 2008, Bevan et al. 2017).

La familia CTX-M se divide en 6 grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8, CTX-M-25 y KLUC, con 210 variantes reportados actualmente (Ding et al. 2018). El grupo CTX-M-1 y el CTX-M-9 son los que tienen una mayor distribución a nivel mundial, siendo la variante CTX-M-15 (del grupo CTX-M-1), la de mayor prevalencia (Bevan et al. 2017, Ding et al. 2018, Rivoarilala et al. 2018).

Las enzimas BLEE del tipo TEM fueron identificadas por primera vez en una *E. coli*, en Atenas (Grecia) en 1965. Estas enzimas fueron ampliamente reportadas en casos de resistencia a β -lactámicos entre bacterias Gram negativas a finales de los años 90s. En la actualidad, se han reportado 180 variantes de esta enzima, siendo las variantes TEM-1 y TEM-2 las que tienen mayor distribución a nivel mundial. Estas enzimas, son responsables de resistencia a penicilina, ampicilina y cefalosporinas de primera generación (López et al. 2016).

Un grupo importante de antibióticos β -lactámicos lo constituyen los carbapenémicos. Este tipo de antibióticos cuenta con un mayor espectro de actividad y con una mayor resistencia a las enzimas β -lactamasas. Por esta razón, son empleados como tratamientos alternativos eficaces en casos de infecciones producidas por bacterias multirresistentes. Su mecanismo de acción es similar al de β -lactámicos tradicionales, pero su efectividad y estabilidad son mucho mayores (Doi et al. 2017). Esta propiedad lo confiere la presencia de un carbono en la posición C-1 y a la configuración trans del anillo β -lactámico en los carbonos C-5 y C-6, incrementando su estabilidad frente a enzimas β -lactamasas (Zeng y Lin 2013).

La resistencia mediada por enzimas se ha incrementado en los últimos años, convirtiéndose en uno de los problemas más graves que la salud pública mundial debe afrontar. En el informe de la Organización Mundial de la Salud del 28 de enero de 2018 se reconoce que esta problemática es una realidad en cualquier parte del mundo. El problema se agrava al considerar que muchas

enterobacterias son resistentes a múltiples drogas (OMS 2018). El Ecuador no es ajeno a esta realidad y desde el año 2010 se ha reportado un incremento de la resistencia bacteriana (Zurita 2013). Datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) muestran que, en el año 2014, 30 269 personas fueron diagnosticadas con enfermedades relacionadas con infecciones bacterianas (INEC 2017).

Materiales y Métodos

Población de estudio.- Los aislados bacterianos fueron obtenidos de un centro hospitalario de tercer nivel de la ciudad de Quito, entre los meses de octubre del 2016 a mayo del 2017. El hospital proporcionó únicamente aislados clínicos de la familia Enterobacteriaceae. El total de aislados colectados fue de 153, de los cuales 22 fueron seleccionados por la producción enzimática de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), previamente identificado por la casa de salud. Los aislados obtenidos fueron llevados al Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), a través del uso de medios de transporte Stuart y medidas de bioseguridad adecuadas. En el laboratorio, los aislados bacterianos fueron procesadas, incorporados y codificados a la Colección Bacteriana – Quito Católica (CB-QCA).

Identificación fenotípica.- La identificación de cada aislado proporcionado por el centro hospitalario se realizó a través de una batería de pruebas bioquímicas establecidas que comprenden el uso de varios medios diferenciales. Los medios de cultivo utilizados en este estudio fueron manufacturados por la empresa BD Difco™ y fueron: agar Citrato de Simmons, agar Triple Azúcar y Hierro (TSI), agar Motilidad-Indol-Lisina (MIL), agar Motilidad-Indol-Ornitina (MIO), caldo Rojo de Metilo y Vogues Proskauer (RM/VP), agar fenilalanina y agar urea (BD Diagnostics 2009).

Obtención de perfiles fenotípicos de resistencia.- El centro hospitalario proporcionó, junto a los aislados bacterianos, los perfiles de resistencia obtenidos a través del sistema automatizado VITEK 2™. Las tarjetas empleadas en la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) fueron AST-N272 (bioMérieux, Inc.). En el laboratorio de Microbiología PUCE se realizaron análisis de sensibilidad a antimicrobianos empleando el método de difusión en disco Kirby-Bauer (Bauer et al. 1966, CLSI 2018). Los discos de antibióticos utilizados en la determinación de la sensibilidad antibiótica fueron: Ampicilina (10 μ g), Ampicilina/Sulbactam (10 μ g/10 μ g), Piperacilina/tazobactam (100 μ g/10 μ g), Cefazolina (30 μ g), Cefoxitina (30 μ g), Ceftriaxona (30 μ g), Cefepima (30 μ g), Gentamicina (10 μ g), Tobramicina (10 μ g), Amikacina (30 μ g), Ácido nalidíxico (30 μ g), Norfloxacin (10 μ g), Ciprofloxacina (5 μ g), Levofloxacina (5 μ g), Trimetoprima/sulfametoxazol (25 μ g) y Aztreonam (30 μ g). La interpretación de los halos de inhibición obtenidos siguió los lineamientos establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI (2018).

Identificación fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). - Para la identificación fenotípica de los aislados productores de BLEE se empleó el Método de sinergia de doble disco. En una placa de MHA se inoculó una suspensión bacteriana al 0,5 de la escala de McFarland. El ensayo empleó discos de Cefotaxima (5 μ g), Cefotaxima/Ácido Clavulánico (30 μ g/10 μ g), Ceftazidima (30 μ g) y Ceftazidima/Ácido Clavulánico (30 μ g/10 μ g) que fueron colocados de manera equidistante. Después de incubar a 37 °C por 18 horas, se midió el diámetro de los halos de inhibición obtenidos. Para la interpretación de resultados, si el halo de inhibición del antibiótico más el inhibidor es 5 mm mayor al del antibióticos sin inhibidor se reporta como una prueba positiva a la producción de BLEE (CLSI 2018).

Identificación fenotípica de carbapenemasas. - La identificación fenotípica de carbapenemasas usó el Triton Hodge Test (THT) que empleó TritonX-100. Para ello, se eliminó la humedad de la superficie de una placa de agar Mueller Hinton (MHA) estéril y se agregó 50 μ L de TritonX-100 en la superficie de la placa de MHA. El TritonX-100 fue distribuido con un cotonete estéril sobre toda la superficie de la placa hasta su completa absorción. Posterior a este procedimiento, se preparó una suspensión de 0,5 en la escala de McFarland, en caldo Mueller Hinton, de la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli*. A continuación, la suspensión fue sembrada en la placa de MHA previamente impregnada de TritonX-100. Una vez inoculada la placa, se colocó un disco de

meropenem (10 µg) en el centro de ésta. Con ayuda de un cotonete estéril, se inoculó en línea recta el microorganismo problema, el cual partió del extremo del disco al borde de la placa. Este proceso se repitió en 2 ocasiones, una con la cepa control positiva (*K. pneumoniae* ATCC BAA 1705) y otra con la cepa control negativa (*K. pneumoniae* ATCC BAA 1706). Finalmente, las placas fueron incubadas a 35 °C por 16 - 18 horas. Para la interpretación de los resultados, se observó la interacción entre el organismo analizado y la cepa ATCC 25922 de *E. coli*. Un resultado positivo demuestra un sobrecrecimiento de la cepa indicadora hacia el disco del carbapenem empleado en la intersección de la estría con la zona de inhibición. Un resultado negativo se interpretó cuando la zona de inhibición permanece inalterada en su intersección con la estría que formó el aislado problema (Pasteran et al. 2016).

Extracción de ADN.- Para la extracción del ADN bacteriano se inocularon los aislados en Caldo Tripticasa de Soya (TSB) e incubaron a 37 °C por 18 horas. A partir de esta suspensión se extrajo el ADN bacteriano de los aislados positivos a las pruebas fenotípicas de BLEE. Se empleó el kit comercial de extracción de ADN total Wizard® Genomic DNA Purification Kit, de la marca Promega®. Se utilizó la guía emitida por el fabricante para la extracción de ADN de bacterias Gram negativas (Promega 2010).

Detección molecular de la presencia de genes de resistencia.- La detección de genes se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes amplificados relacionados con la producción de BLEE fueron: *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV}. Para identificar la presencia de genes relacionados a la producción de carbapenemasas se analizaron: *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM}.

Las reacciones de amplificación emplearon un volumen final de 25 µL que contenían: 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega™); 9,5 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de cada cebador (10 µM) y 1 µL de ADN (10 ng/µL). Las condiciones, productos y cebadores empleados en las reacciones de amplificación se detallan en la Tabla 1.

La PCR se realizó en el termociclador de gradiente MultiGene™ (modelo TC9600-G-) de la empresa LabNet Internacional. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis convencional a 100 V por 1 hora, en geles de agarosa al 1 %. El buffer utilizado para los geles y la corrida electroforética fue TBE 0,5X (44,5mM Tris Base, 44,5 mM ácido bórico, 12,5mM EDTA).

Tabla 1. Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en Enterobacterias.

Nombre del Gen	Nombre del cebador	Secuencia	Temperatura de anillamiento	Amplíción (pb)	Referencias
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M F	ATAAAACCGGCAGCGGTG	59 °C	483 pb	Fatemeh et al. 2016
	CTX-M R	GAATTTTGACGATCGGGG			
<i>bla</i> _{TEM}	TEM F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	50 °C	858 pb	Ranjbar et al. 2018
	TEM R	CCAATGCTTAATCAGTGAGG			
<i>bla</i> _{SHV}	SHV F	TTTATCGGCCYCTACTCAAGG	55 °C	862 pb	Kang et al. 2019
	SHV R	GCTGCGGGCCGGATAACG			
<i>bla</i> _{NDM}	NDM F	CACCTCATGTTTGAATTCGCC	52 °C	984 pb	Dortet et al. 2012
	NDM R	CTCTGTACATCGAAATCGC			
<i>bla</i> _{VIM}	VIM F	ATGGTGTTTGGTTCGCATATC	52 °C	500 pb	Poirel et al. 2000
	VIM R	TGGGCCATTCAGCCAGATC			
<i>bla</i> _{IMP}	IMP F	GAAGGCGTTTATGTTTCATACTT	52 °C	587 pb	Elena et al. 2018
	IMP R	GTTTTGCCTTACCATATTTGGA			
<i>bla</i> _{KPC}	KPC F	CGGAACCATTGCTAAACTC	55 °C	738 pb	Iñiguez et al. 2010
	KPC R	GGCCTCGCTGTRCTTGTCAT			

pb = pares de bases

Como marcador de peso molecular se utilizó TrackIt™ 100 pb ADN Ladder (Invitrogen). La tinción de los geles de electroforesis obtenidos empleó SYBR® Gold 10.000X (Invitrogen). Para la visualización del gel se usó el sistema de captura de imagen Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD).

Secuenciación de los productos de amplificación.- Los productos de amplificación que presentaron el peso molecular correspondiente al amplicón obtenido a partir del organismo control fueron enviados a la empresa MACROGEN Inc., Corea del Sur, para su purificación y secuenciación. Las secuencias resultantes fueron importadas al programa bioinformático Geneious Prime versión 2019.2.1 y comparadas con las secuencias obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para cada gen.

Tipificación Molecular.- La tipificación de los aislados bacterianos positivos a la producción de BLEE se realizó mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) siguiendo los procedimientos estandarizados por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para los laboratorios de la Red Internacional PulseNet (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>). El protocolo empleado fue el recomendado para la subtipificación de *E. coli* 0157:H7, *E. coli* Non-0157, *Salmonella*, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*. El PFGE se realizó con el sistema CHEF DR-III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La cepa *Salmonella enterica* serotipo Braenderup (H9812) fue utilizada como estándar de tamaño molecular para la comparación y normalización de los fragmentos obtenidos por la digestión del cromosoma bacteriano con la enzima de restricción *Xba*I. Los patrones de restricción fueron analizados por el software BioNumerics Seven (Applied Math, Sint-Maten-Latem, Belgium) empleando el coeficiente de similitud de DICE y el algoritmo UPGMA con 1,5 % de tolerancia y 1,5 % de optimización. Para la generación del dendrograma se aplicó un coeficiente de similaridad mayor al 90 %.

Resultados

Población de estudio.- De los 153 aislados bacterianos obtenidos, únicamente se seleccionaron los que presentaron el fenotipo BLEE. Con el Método de sinergia de doble disco, 14 aislados arrojaron resultados positivos y por el método automatizado VITEK 2™, 21 fueron positivos. Se comparó los aislados positivos por cada método, y se seleccionó los que fueron positivos para al menos uno de ellos. Así, se obtuvieron 22/153 aislados con el fenotipo de interés.

De los 22 aislados positivos fenotípicamente a la producción de BLEE, el 86,4 % (19/22) de los aislados fueron identificados como *Escherichia coli*, mientras que el 13,4 % (3/22) restante fueron individuos de la especie *Klebsiella oxytoca* (Tabla 2).

El origen de los aislados mostró que el 54,55 % (12/22) de los aislados fueron obtenidos a partir de muestras de orina; 18,18 % (4/22) procedieron de heridas quirúrgicas; 9,09 % (2/22) fueron obtenidos de punta de catéteres; 4,55 % (1/22) se obtuvo a partir de líquido peritoneal; 4,55 % (1/22) de secreción de herida quirúrgica; 4,55 % (1/22) de sangre y 4,55 % (1/22) de secreción de muñón de histerectomía (Tabla 2).

Obtención de perfiles fenotípicos de resistencia.- Los valores obtenidos en las pruebas de difusión en disco complementó a los resultados reportados por el sistema automatizado VITEK 2™ proporcionado por el centro hospitalario. Las pruebas obtenidas por el Método de difusión determinaron que el 100 % (22/22) de los aislados fueron resistentes a ampicilina; 63,64 % (14/22) fueron resistentes a ampicilina/sulbactam; 13,64 % (3/22) fueron resistentes a piperacilina/tazobactam; 90,91 % (20/22) a cefazolina; 9,09 % (2/22) a cefoxitina; 81,82 % (18/22) a ceftriaxona; 36,36 % (8/22) a cefepima; 13,64 % (3/22) a gentamicina; 9,09 % (2/22) a tobramicina; 4,55 % (1/22) a amikacina; 72,73 % (16/22) a ácido nalidíxico; 68,18 % (15/22) a norfloxacin; 68,18 % (15/22) a ciprofloxacina; 63,64 % (14/22) a levofloxacina; 54,55 % (12/22) a trimetoprima/sulfametoxazol y 59,09 % (13/22) a aztreonam (Tabla 2).

Los resultados de los antibióticos analizados por el método automatizado VITEK 2™ fueron: 100 % (2/2) fueron resistentes a ampicilina; 72,73 % (16/22) a ampicilina/sulbactam; 20 % (4/20)

Tabla 2. Codificación PUCE, datos de origen de los aislados bacterianos, identificación, sensibilidad antibiótica a β-lactámicos por el método de difusión en disco, determinación de BLEE, determinación de carbapenemasas por THT, presencia/ausencia de genes bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{KPC}, bla_{VIM}, bla_{IMP} y bla_{NDM}.

Código PUCE CB-QCA	Origen del aislado	Especie	AM	AMK	ATM	CIP	CRO	CZ	TEP	FOX	GN	LX	NA	NOR	SAM	SXT	TOB	TZP	BLEE	THT	bla _{CTX-M}	bla _{TEM}	bla _{SHV}	bla _{KPC}	bla _{VIM}	bla _{IMP}	bla _{NDM}
(Halos de inhibición en mm)																											
4562	LP	<i>E. coli</i>	R6 S23 S37	R6 S23 S37	R6 S37	R6 S37	I21 S36	S29 R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	S15 S26	S26	+	-	1	1	0	0	0	0	0
4563	HQ	<i>E. coli</i>	R6 S19 R14	R6 S19 R14	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R16 S25	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S22	R10 S22	+	-	0	0	0	0	0	0	0
4567	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S20 S31	R6 S20 S31	R6 S32	R6 S32	S23 S30	S25 S23 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S22	I13 S22	+	-	0	0	0	0	0	0	0
4609	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S18 S30	R6 S18 S30	R6 S32	R6 S32	S21 S29	S25 S22 R8 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S22	I13 S22	+	-	1	0	0	0	0	0	0
4610	Orina	<i>E. coli</i>	R6 R6 I19	R6 R6 I19	R6 R12	R6 R12	R6 I21	S20 S21 R6 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S25	S21 S25	+	-	0	0	0	0	0	0	0
4668	HQ	<i>E. coli</i>	R6 S18 R14	R6 S18 R14	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R18	S22 S22 S17 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	I20	+	-	1	0	0	0	0	0	0
4683	HQ	<i>E. coli</i>	R6 S20 R16	R6 S20 R16	R6 R11 R6	R6 R11 R6	R6 I19	S23 S22 R7 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	S21	+	-	1	0	0	0	0	0	0
4687	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S25 I18	R6 S25 I18	R6 S37	R6 S37	R6 I21	S25 S23 S39 S21	R6 R10 R6	R6 R10 S27	S27	+	-	0	0	0	0	0	0	0							
4688	HQ	<i>E. coli</i>	R6 S21 R14	R6 S21 R14	R6 R6 R11	R6 R6 R11	R6 I19	S23 S21 R7 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	S21	+	-	1	0	0	0	0	0	0
4694	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S21 S30	R6 S21 S30	R6 R6 I20	R6 R6 I20	R6 S28	R12 S23 R6 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	I20	+	-	0	0	0	0	0	0	0
4697	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S26 S24	R6 S26 S24	R6 I16	R6 I16	R6 S29	S29 S28 I16 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	S29	+	-	0	1	0	0	0	0	0
4699	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S20 R6	R6 S20 R6	R6 R6 R6	R6 R6 R6	R6 R10	R6 R7 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	I19	+	-	1	1	0	0	0	0	0
4702	SHQ	<i>E. coli</i>	R6 S20 R15	R6 S20 R15	R6 R6 R10	R6 R6 R10	R6 R17	S22 S22 R7 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	S21	+	-	1	0	0	0	0	0	0
4711	Sangre	<i>K. oxytoca</i>	R6 S25 R15	R6 S25 R15	R6 S35	R6 S35	R6 S28	S28 S23 S32 S25 S33	R6 R10 R6	R6 R10 S21	R14	+	-	0	0	0	0	0	0	0							
4719	PC	<i>K. oxytoca</i>	R6 S23 R15	R6 S23 R15	R6 S32	R6 S32	R6 S25	S25 S23 S33 S31	R6 R10 R6	R6 R10 S21	R13	+	-	0	0	0	0	0	0	0							
4731	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S20 R17	R6 S20 R17	R6 R6 R6	R6 R6 R6	R6 R14	S20 S23 R6 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	S25	+	-	1	0	0	0	0	0	0
4757	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S24 R10	R6 S24 R10	R6 R6 R6	R6 R6 R6	R6 R14	S24 S25 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	S28	+	-	1	0	0	0	0	0	0
4786	PC	<i>K. oxytoca</i>	R6 S24 R11	R6 S24 R11	R6 S28	R6 S28	R6 S25	S27 S26 S28 S23 S26	R6 R10 R6	R6 R10 S21	R15	+	-	0	0	0	0	0	0	0							
4852	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S29 R13	R6 S29 R13	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 I19	S26 S24 R6 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	S29	+	-	1	0	0	0	0	0	0
4990	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S20 S22	R6 S20 S22	R6 R6 R13	R6 R6 R13	R6 I22	S26 S20 R6 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	S27	+	-	0	0	0	0	0	0	0
4991	Orina	<i>E. coli</i>	R6 S21 S31	R6 S21 S31	R6 S33	R6 S33	R6 S30	S23 S22 S32 S23	R6 R10 R6	R6 R10 S21	S24	+	-	0	1	0	0	0	0	0							
5004	SMH	<i>E. coli</i>	R6 S17 R13	R6 S17 R13	R6 R6 R6	R6 R6 R6	R6 R14	S24 S20 R6 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 R6	R6 R10 S21	I20	+	-	1	0	0	0	0	0	0

CB-QCA, Colección Bacteriana-Quito Católica; HQ, herida quirúrgica; PC, punta de catéter; LP, Líquido peritoneal; SHQ, secreción de herida quirúrgica; SMH, secreción de muñón de histerectomía. R, Resistente; S, Sensible; I, Intermedio. AM, ampicilina; AMK, amikacina; ATM, aztreonam; CIP, ciprofloxacina; CRO, ceftriaxona; CZ, ceftazolidina; FEP, cefepima; FOX, ceftioxina; GN, gentamicina; LX, levofloxacina; NA, ácido nalidixico; NOR, norfloxacina; SAM, Ampicilina/sulbactam; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; TOB, tobramicina; TZP, piperacilina/tazobactam. BLEE, β-lactamasas de espectro extendido; THT, Triton Hodge Test. (+), positivo; (-), negativo; (1), presencia; (0), ausencia.

a piperacilina/tazobactam; 50 % (1/2) a cefalotina; 50 % (1/2) a cefuroxima; 9,09 % (1/11) a cefoxitina; 90 % (18/20) a ceftazidima; 90,48 % (19/21) a ceftriaxona; 90,48 % (19/21) a cefepima; 4,55 % (1/22) a amikacina; 13,64 % (3/22) a gentamicina; 72,73 % (16/22) a ciprofloxacina; 50 % (1/2) a norfloxacina y 50 % (1/2) a trimetoprima/sulfametoxazol. Para fosfomicina, nitrofurantoina, tigeciclina y cefotaxima no se reportaron aislados resistentes a ninguno de estos antibióticos.

Identificación fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).- En la prueba de sinergia de doble disco se encontró que para cefotaxima/ácido clavulánico vs cefotaxima 14/22 aislados dieron positivo a la producción de BLEE, mientras que en ceftazidima/ácido clavulánico vs. ceftazidima, 11/22 aislados dieron un resultado positivo (CLSI 2018).

El análisis por el sistema automatizado VITEK 2™ determinó que 21 aislados presentaron el fenotipo BLEE, siendo el aislado CB-QCA 4562, el único identificado como negativo a la producción de BLEE por parte del centro hospitalario, pero con un resultado positivo por el método de sinergia de doble disco.

En relación a la detección fenotípica de la producción de carbapenemasas por el método THM, ningún aislado fue positivo a la producción de estas enzimas. En los análisis realizados por VITEK 2™, no se detectó ningún aislado resistente a los 4 carbapenémicos probados (doripenem, ertapenem, imipenem y meropenem).

Detección molecular de la presencia de genes de resistencia.- La visualización de los productos de PCR demostró la presencia/ausencia de genes productores de BLEE y carbapenemasas. Se comparó las bandas obtenidas en los geles de electroforesis convencional con el marcador de peso molecular, buscando aquellas que coincidían con tamaño reportado para el amplicón del control positivo (Tabla 2).

De los 22 aislados analizados el 50 % (11/22) presentó el gen bla_{CTX-M} y 18,18 % (4/22) el gen bla_{TEM} . Ningún aislado presentó el gen bla_{SHV} (Figura 1 y Figura 2).

Ninguno de los 22 aislados estudiados dio positivo a la presencia de los 4 genes analizados para la producción de carbapenemasas: bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{KPC} y bla_{NDM} .

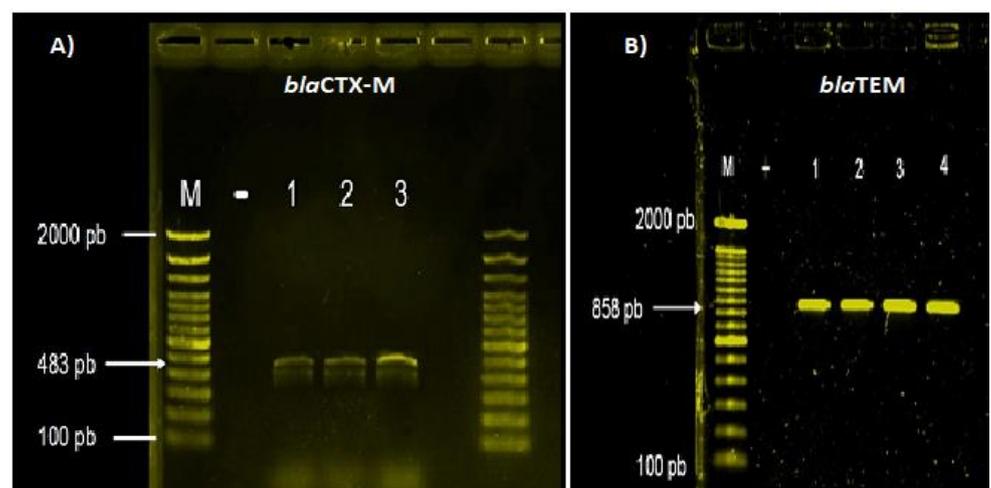


Figura 1. A) Productos de amplificación obtenidos para el gen bla_{CTX-M} . M, marcador de peso molecular (100 pb). (-), control negativo; (1), CB-QCA 4562; (2), CB-QCA 4609; (3), CB-QCA 4668. B) Productos de amplificación obtenidos para el gen bla_{TEM} . M, marcador de peso molecular (100 pb). (-), control negativo; (1), CB-QCA 4562; (2), CB-QCA 4697; (3), CB-QCA 4699; (4), CB-QCA 4991.

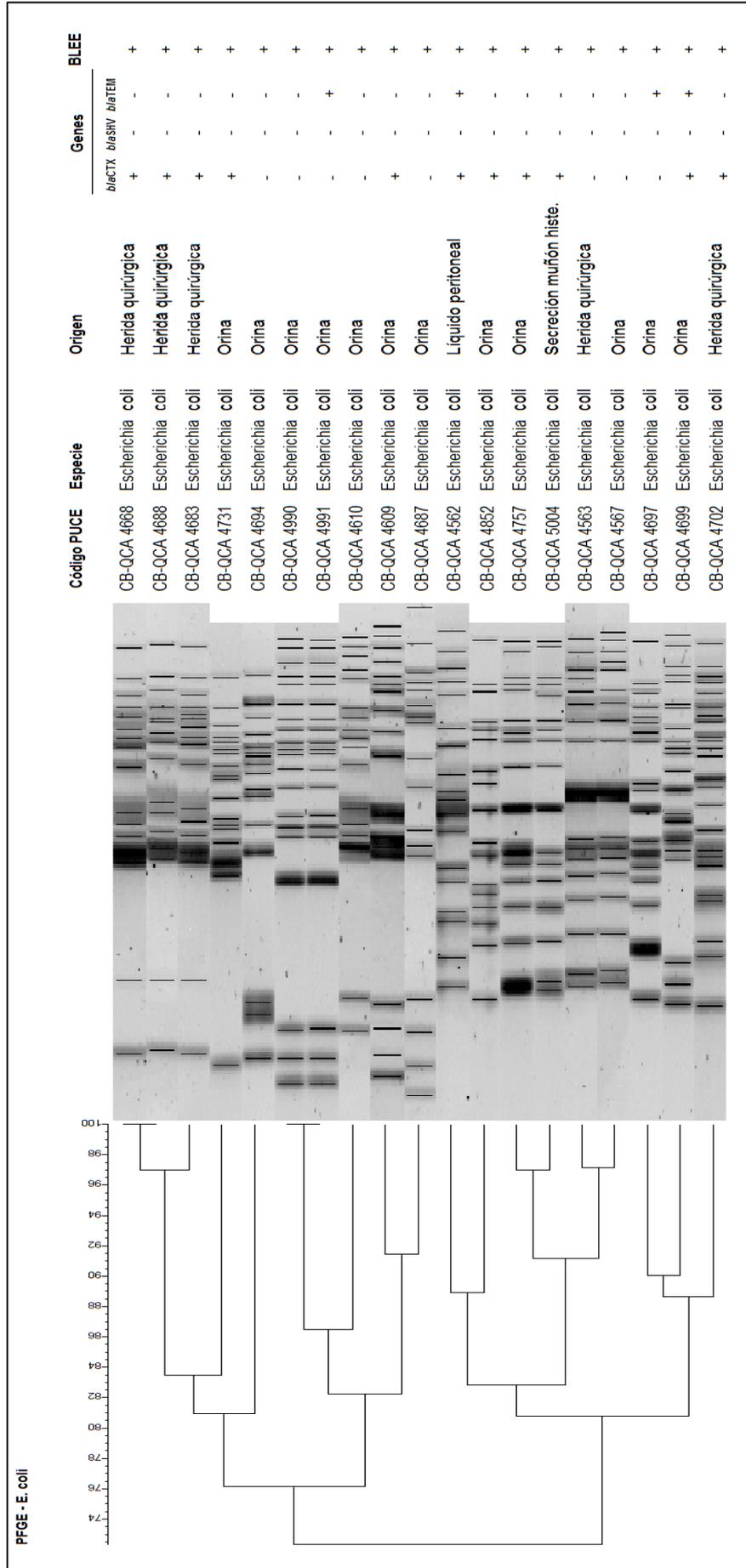


Figura 2. Dendrograma que demuestra las relaciones existentes entre los diferentes pulsotipos obtenidos a partir de la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) de *E. coli*. El dendrograma muestra una relación clonal del 100 % entre los pulsotipos CB-QCA 4668 con CB-QCA 4688 y los pulsotipos CB-QCA 4990 con CB-QCA 4991. El dendrograma fue generado mediante el método UPGMA con 1,5 % de tolerancia y 1,5 % de optimización. Entre los datos presentes en el dendrograma se incluye el código PUCE, la especie, el origen de los aislados, la presencia/ausencia de genes codificantes de BLEE y el resultado fenotípico a la detección de BLEE.

Identificación de variantes alélicas.- La identificación se realizó comparando las secuencias de los aislados analizados con las secuencias depositadas en el NCBI de las diversas variantes alélicas. Se amplificaron 2 de los 7 genes analizados: *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM}. De los 22 aislados, 13 aislados presentaron al menos uno de estos genes. El gen *bla*_{TEM} se observó en 4 aislados y pertenecían a la variante *bla*_{TEM-1} (número de accesoión NG_050145.1). 11 aislados fueron portadores del gen *bla*_{CTX-M} y todos fueron identificados con la variante alélica *bla*_{CTX-M-15} (Número de accesoión NG_048935.1).

Tipificación molecular.- El PFGE realizado a los 22 aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE empleó un punto de corte de similitud > 90 %. El análisis de PFGE mostró heterogeneidad genética entre los aislados revelando 17 pulsotipos distintivos (Figura 2). Se formaron 2 clusters distintivos (grupo 1 y grupo 2) con 3 y 2 aislados respectivamente y mostraron un coeficiente de similitud del 97 % y 100 % cada uno. Los aislados del grupo 1 mostraron relación con la expresión de genes *bla*_{CTX-M} y los aislados del grupo 2 se relacionaron con la ausencia de estos genes. Los 17 pulsotipos restantes, que corresponden al 77,3 % de los aislados, mostraron coeficientes de similitud del 80 al 90 % (Figura 2).

Discusión

Las bacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) son una verdadera amenaza para la sociedad, convirtiéndose en un problema mayor para los sistemas de salud a nivel mundial. El presente estudio demostró que *Escherichia coli* fue la especie predominante en la población estudiada, con el 86,36 % (19/22) de aislados identificados. Este resultado coincide con otros reportes de nuestro país observados en trabajos de Calva et al. (2016), Supliguicha et al. (2017) y Pachay (2018). La predominancia de *E. coli* productoras de BLEE entre los aislados de origen clínico, no sólo se observa en el país, sino en varias partes del continente americano, como es el caso del estudio de Blanco et al. (2016) y Villegas et al. (2016) quienes reportan porcentajes similares de aislados de *E. coli* de origen clínico para Colombia, y los trabajos de Morones et al. (2016) para México.

Junto a *Escherichia*, el género bacteriano mayormente descrito en otros estudios de bacterias productoras de BLEE es el género *Klebsiella*, que ha llegado a establecerse como cepas endémicas en varios de países de América (Guzmán et al. 2014). Este estudio reportó la presencia del 13,64 % (3/22) de aislados relacionados con la especie *Klebsiella oxytoca*. Si bien, *Klebsiella pneumoniae* suele ser el mayor representante del género *Klebsiella*, estudios realizados en el país y el continente demuestran que *K. oxytoca* está presente en un porcentaje similar a *K. pneumoniae*, alineándose con los resultados obtenidos en esta investigación (Calva et al. 2016, Guillén et al. 2016, Morones et al. 2016, Supliguicha et al. 2017).

La mayoría de los aislados fueron obtenidos a partir de muestras de orina con el 54,55 % (12/22) y heridas quirúrgicas con el 18,18 % (4/22). Todos los aislados fueron identificadas como *Escherichia coli*. La predominancia de *E. coli* entre los aislados procedentes de muestras de orina se debe a que *E. coli* es una bacteria comensal del sistema digestivo de todos los animales homeotermos. La cercanía anatómica entre el ano e inicio de la uretra, sobretodo en la anatomía femenina, aumenta la posibilidad de infecciones del tracto urinario (ITU) relacionados con la presencia de esta bacteria (Villar et al. 2014, Flores et al. 2015, Mathers et al. 2015). El segundo origen más común reportado fue de punta de catéter con el 9,09 % (2/22). Los 2 aislados fueron identificados como *K. oxytoca*. Los distintos orígenes de cada aislado se relacionan a infecciones bacterianas asociadas a la atención en salud. Estudios como el de Rivera et al. (2015) muestran la capacidad de estas dos especies, en especial de *K. oxytoca*, de sobrevivir en superficies inanimadas dentro del ambiente hospitalario. Esto explicaría el origen de su constante presencia (López, 2014, Rivera et al. 2015).

Al analizar los perfiles de resistencia obtenidos con el método de difusión en disco, las resistencias predominantes fueron a ampicilina, cefazolina y ceftriaxona. Para el método automatizado VITEK 2™ los perfiles de resistencia predominantes fueron a ampicilina/sulbactam, ceftazidima, ceftriaxona y cefepima. Si bien, los antibióticos para los que existen un mayor porcentaje de resistencia, difieren entre un método y otro, a excepción de ceftriaxona, se observa que la

resistencia a cefalosporinas está bien marcada. Se presenta resistencia tanto a cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y ceftriaxona), y cuarta generación (cefepima). Esto supone un grave problema en el tratamiento de infecciones relacionadas a bacterias con este tipo de resistencias. Las cefalosporinas son usadas como un tratamiento efectivo y de amplio espectro para tratar infecciones relacionadas con bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además, se usan como terapia alternativa para pacientes alérgicos a las penicilinas (Macy y Contreras 2015, Oliveira et al. 2015). Su inactivación se traduce en incrementos en el uso de antibióticos reservados para casos de resistencia, como los carbapenémicos. Este problema aumenta el riesgo de generar resistencias a estas alternativas terapéuticas (Oliveira et al. 2015). Al comparar los perfiles de resistencia obtenidos con estudios similares a nivel nacional, vemos que la resistencia a ampicilina, ampicilina/sulbactam y trimetoprima/sulfametoxazol se han incrementado en gran medida en los últimos años. Estos resultados coinciden con estudios reportados en Latinoamérica por Villar et al. 2014 y Calva et al. 2016.

La producción de carbapenemasas evaluada por el Triton Hodge Test (THT) indicó que el 100 % de los aislados analizados no presentaron producción de estas enzimas. Los resultados obtenidos por el método automatizado VITEK 2™, mostró el mismo resultado. En el estudio planteado por Codjoe y Donkor (2017) la falta de evidencia fenotípica no significa que los aislados no sean portadores de genes relacionados a dichas resistencias. Por tanto, se analizó la presencia de genes relacionados a estas resistencias para descartar la presencia de posibles portadores.

Desde el surgimiento de las primeras bacterias productoras de BLEE, las enzimas mayormente reportadas fueron los tipos TEM y SHV. En la actualidad las enzimas predominantes corresponden al tipo CTX-M (Blanco et al. 2016). Cada una de las variantes de CTX-M está relacionado con un mayor o menor índice de resistencia a ciertos tipos de antibióticos β-lactámicos. Por este motivo, el análisis molecular de genes de resistencia es siempre necesario y complementario a los análisis fenotípicos. En el caso de esta investigación se encontró que el 50 % (11/22) de los aislados presentaron el gen *bla*_{CTX-M} en específico la variante *bla*_{CTX-M-15}.

La variante *bla*_{CTX-M-15} se caracteriza por ser prevalente a escala mundial, siendo reportada en América del Norte y Sur, África, Asia y Europa. Solo en China la variante predominante es la *bla*_{CTX-M-14} (Chen et al. 2014, Seiffert et al. 2014, Sidjabat y Paterson 2015, Fatemeh et al. 2016). La presencia de *bla*_{CTX-M-15} está en relación con los resultados documentados por Calva et al. (2016) para Ecuador y por Colquechagua et al. (2015) y Blanco et al. (2016) para Colombia y Perú respectivamente. Cantón et al. (2012) explican que la rápida propagación de este tipo de enzima BLEE se debe a la facilidad con la que puede ser transmitida al asociarse a plataformas genéticas móviles como plásmidos y transposones, lo que explicaría la predominancia de esta enzima en particular. Cantón et al. (2012) también reporta la relación de la variante *bla*_{CTX-M-15} con el plásmido FII, llamado "plásmido de resistencia epidémica", caracterizado por su capacidad y facilidad de adquirir genes de resistencia (Cantón et al. 2012).

Los aislados que presentaron el gen *bla*_{CTX-M-15} mostraron altos porcentajes de resistencia a penicilinas, cefalosporinas (primera, segunda y tercera generación) y quinolonas. La resistencia a otro tipo de antibiótico, como las quinolonas, se relaciona con lo descrito por Flores-Mireles et al. (2015). Este estudio mostró que los genes de resistencia a quinolonas, como el gen *qnrB* son heredados junto a genes de resistencia a β-lactámicos como *bla*_{CTX-M-15} (Flores-Mireles et al. 2015). Esta relación también se observa en el estudio realizado por Azargun et al. (2018) donde se observa una gran prevalencia de resistencia a quinolonas en aislados portadores del gen *bla*_{CTX-M-15}.

Los 4 aislados de *E. coli* productores de la enzima TEM presentaron la variante alélica *bla*_{TEM-1}. La producción de la enzima TEM está relacionada con resistencia a ampicilina, penicilina y cefalosporinas. Otros estudios realizados en Ecuador demuestran que la variante *bla*_{TEM-1} es la predominante en el país (Calva et al. 2016). De igual manera, el estudio de Díaz (2017), reportó que las variantes alélicas presentes fueron *bla*_{TEM-1} y *bla*_{TEM-214}, siendo *bla*_{TEM-1} la predominante, resultados similares a los reportados en el presente estudio. La variante alélica obtenida *bla*_{TEM-1} no es considerada como una Betalactamasa de Espectro Extendido debido a su limitada

capacidad de hidrolizar penicilinas. Esto hace que sea catalogada como una enzima tipo Betalactamasa de Espectro Ampliado (Smet et al. 2010).

En la identificación fenotípica de BLEE, 9/22 aislados presentaron un perfil de resistencia concordante con el fenotipo, pero no presentaron ninguno de los genes codificantes de BLEE analizados. Como Rivera et al. (2015) plantea, es posible que los aislados sean portadores de otro tipo de genes relacionados con la producción de BLEE como bla_{PER} , bla_{VEB} , bla_{GES} , bla_{BES} , bla_{TLA} y bla_{OXA} (Aggeliki et al. 2014, Bajpai et al. 2017). Otra opción sugiere que los aislados que presentan el fenotipo BLEE son portadores del gen cromosómico inducible AmpC (Rivera et al. 2015).

La presencia de este gen está relacionada con la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, cafamicinas y aztreonam. Este gen está presente en el cromosoma de algunas bacterias y también puede ser adquirido a través de elementos genéticos móviles como plásmidos (Sidjabat y Paterson 2015, Alonso et al. 2016).

En la tipificación molecular obtenida por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado con un criterio de similitud del 90 % se observó que no existe diseminación clonal entre los aislados analizados. Además, se pudo determinar la presencia de tres perfiles de restricción con porcentajes de similitud de 88 al 90 % y dos grupos clonales con similitud del 100 %. Esto se traduce en la ausencia de brotes o la diseminación de un pulsotipo dominante en la población de estudio. El análisis además demostró cuatro patrones con un perfil único de restricción. Un resultado de homogeneidad se reporta comúnmente entre aislados productores de betalactamasas tipo CTX-M, relacionándose con la presencia del gen en específico $bla_{CTX-M-15}$. Sin embargo, la diversidad de los pulsotipos observados demuestra la diversidad de aislados de *E. coli* obtenidos (Lzydorczyk et al. 2020).

Conclusiones

- Los aislados bacterianos de origen hospitalario obtenidos mostraron capacidad de producir β -lactamasas de espectro extendido y no carbapenemasas.
- La especie predominante en el estudio fue *E. coli* seguida de *K. oxytoca*. Este resultado concuerda con los urocultivos que fueron el origen de las muestras más común entre los aislados analizados.
- Los métodos de identificación de sensibilidad antibiótica obtenida por difusión en disco y VITEK 2™ mostraron ser precisos y efectivos.
- Los análisis moleculares caracterizaron el tipo de resistencia que se manifiesta relacionando la presencia de los genes $bla_{CTX-M-15}$ y bla_{TEM-1} con la sensibilidad antibiótica obtenida.
- Los aislados positivos a la detección fenotípica de BLEE, pero no reportaron genes característicos asociados a la producción de estas enzimas estarían expresando otro tipo de genes o mecanismo de resistencia.
- La presencia de genes $bla_{CTX-M-15}$ y bla_{TEM-1} en los aislados estudiados, variantes alélicas predominante a nivel mundial, denota su eficacia en la transmisión y permanencia en la población bacteriana estudiada.
- La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado mostró la ausencia de diseminación clonal entre los aislados analizados.

Agradecimientos

Un cordial agradecimiento a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento a través de proyectos PUCE 2018, Código O13020. También al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas donde se llevó a cabo el presente trabajo de investigación. A todos los integrantes del laboratorio de Microbiología quienes colaboraron de manera eficaz y desinteresada. Finalmente, un agradecimiento especial a los directivos de la Casa de Salud que colaboraron gentilmente con la donación de los aislados analizados en este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Duncan Coral: recolección de datos, análisis e interpretación de datos, redacción de la versión inicial del manuscrito y revisión del manuscrito.

Ilina Alcocer: concepción y diseño del estudio, diseño experimental del estudio, revisión del manuscrito y gestión de financiamiento.

María Fernanda Yauri: concepción y diseño del estudio, diseño experimental del estudio, adquisición y análisis de aislados bacterianos, redacción de la versión inicial y final del manuscrito, revisión del manuscrito y gestión de financiamiento.

Referencias bibliográficas

Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta R. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacteriales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. *Int J Syst Evol Microbiol*. 66(12):5575–5599.

Aggeliki P, Evgenia G, Georgia V, Vassiliki K, Theodoros P, Spyros P, Athanassios T. 2014. Test for Phenotypic Detection of ESBLs among Enterobacteriaceae Producing Various β -Lactamases. *J Clin Microbiol*. 52(5):1483–1489.

Alonso N, Miró E, Pascual V, Rivera A, Simó M, Garcia MC, Xercavins M, Morera MA, Espejo E, Gurguí M, et al. 2016. Molecular characterisation of acquired and overproduced chromosomal blaAmpC in Escherichia coli clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 47(1):62–68.

Azargun R, Sadeghi M, Hossein M, Barhaghi S, Kafil H, Yeganeh F, Oskouee M, Ghotaslou R. 2018. The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and ESBL-production in enterobacteriaceae isolated from urinary tract infections. *Infect Drug Resist*. 11:1007–1014.

Bajpai T, Pandey M, Varma M, Bhatambare G. 2017. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M β -Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna J Med*. 7(1):12–16.

BD Diagnostics. 2009. Difco and BBL Manual Manual of Microbiological Culture Media 2nd Edition.

Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing By A Standardized Single Disk Method. *Am J Clin Pathol*. 45(4):493–496.

Bevan E, Jones A, Hawkey P. 2017. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*. 72(8):2145–2155.

Blanco V, Maya J, Correa A, Perenguez M, Muñoz J, Motoa G, Pallares C, Rosso F, Matta L, Celis Y, et al. 2016. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 34(9):559–565.

Brolund A, Sandegren L. 2016. Characterization of ESBL disseminating plasmids. *Infect Dis (Auckl)*. 48(1):18–25.

Calva D, Toledo Z, Ochoa S, Arévalo A, Ausili A. 2016. Detection and molecular characterization of β -lactamase genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria in Southern Ecuador. *Brazilian J Infect Dis*. 20(6):627–630.

Cantón R, González-Alba J, Galán J. 2012. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol*. 3(APR).

(CDC) Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Vital Signs: Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 62(9):165–170.

Chen L, Freeman J, Nicholson B, Keiger A, Lancaster S, Joyce M, Woods C, Cook E, Adcock L, Louis S, et al. 2014. Widespread dissemination of CTX-M-15 genotype extended-spectrum- β -

- lactamase-producing enterobacteriaceae among patients presenting to community hospitals in the southeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(2):1200–1202.
- Cho H, Uehara T, Bernhardt T. 2014. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell.* 159(6):1300–1311.
- (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards M02, M07, and M11.
- Codjoe F, Donkor E. 2017. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci.* 6(1):1.
- Colquechagua F, Sevilla C, Gonzales E. 2015. Artículo Original de espectro extendido en muestras fecales en el enterobacteriaceae in fecal samples at the national. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 32(1):26–32.
- D'Andrea M, Arena F, Pallecchi L, Rossolini G. 2013. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 303(6–7):305–317.
- Díaz V. 2017. Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados clínicos de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos y pruebas de inhibición con péptidos de *Boana rosenbergi* y *Rana sp.* [tesis]. [Quito (UIO)]: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Ding H, Liu B, Gao Y, Zhong X, Duan S, Yuan L. 2018. Divergence of affinities, serotypes and virulence factor between CTX-M *Escherichia coli* and non-CTX-M producers. *Poult Sci.* 97(3):980–985.
- Doi Y, Iovleva A, Bonomo RA. 2017. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med.* 24(1):S44–S51.
- Dortet L, Nordmann P, Poirel L. 2012. Association of the Emerging Carbapenemase NDM-1 with a Bleomycin Resistance Protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 56(4):1693.
- Elena A, Cejas D, Magariños F, Jewtuchowicz V, Facente A, Gutkind G, Di Conza J, Radice M. 2018. Spread of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Harboring an IncA/C1 Plasmid Encoding IMP-8 and Its Recruitment into an Unrelated MCR-1-Containing Isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 62(6): 02414-02417.
- Fatemeh F, Hamed A, Ali H, Hossein G, Latif G, Parastoo H. 2016. Antibiotic susceptibility patterns in CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolated from healthy Afghan refugees in Iran. *African J Microbiol Res.* 10(11):357–362.
- Flores A, Walker J, Caparon M, Hultgren SJ. 2015. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 13(5):269–284.
- Guillén, R. et al. 2016. Detección molecular de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias aisladas en Asunción. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 14(1):8–16.
- Guzmán-Blanco M, Labarca J, Villegas M, Gotuzzo E. 2014. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. *Brazilian J Infect Dis.* 18(4):421–433.
- Iñiguez D, Zurita J, Alcocer I, Ortega D, Gómez AM, Maldonado L. 2012. *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-2: primer reporte en el Ecuador. *Rev la Fac Ciencias Médicas.* 37(1–2):40–43.
- INEC (2017). Programa Nacional de Estadística 2017-2021. Instituto Nacional de Estadística y Censos, Quito-Ecuador.

- Izydorczyk C, Waddell B, Edwards B, Greysen-Wong J, Surette M, Somayaji R, Rabin H, Conly J, Church D, & Parkins M. 2020. Epidemiology of *E. coli* in Cystic Fibrosis Airways Demonstrates the Capacity for Persistent Infection but Not Patient-Patient Transmission. *Frontiers in microbiology*, 11, 475. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00475>
- López L. 2014. Papel del ambiente hospitalario y los equipamientos en la transmisión de las infecciones nosocomiales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 32(7):459–464.
- López D, Torres M, Prada C. 2016. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Univ y Salud*. 18(1):190.
- Macy E, Contreras R. 2015. Adverse reactions associated with oral and parenteral use of cephalosporins: A retrospective population-based analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 135(3):745-752.e5.
- Mathers A, Peirano G, Pitout J. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. 28(3):565–591.
- Morones I, Salgado T, Gonzaga T, Matamoros A, Terán J, Arteaga S, Castro L, Reyes A, López D, Meza D. 2016. Enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido en hemocultivos y urocultivos. *Med Interna Mex*. 32(4):381–387.
- Numanovic F, Hukic M, Delibegovic Z, Tihic N, Pasic S. 2013. Comparison of double disk synergy test, VITEK 2 and Check- MDR CT102 for detection of ESBL producing isolates. *Acta Medica Acad* 2013. 42(1):15–24.
- Oliveira M, Oliveira C, Gonçalves K, Santos M, Tardelli A, Nobre V. 2015. Enterobacteriaceae resistant to third generation cephalosporins upon hospital admission: Risk factors and clinical outcomes. *Brazilian J Infect Dis*. 19(3):239–245.
- Kang H, Wang L, Li Y, Lu Y, Fan W, Bi R, Qian H, Gu B. 2019. Dissemination of Multidrug-Resistant *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* with Class 1, Class 2, and Atypical Class 1 Integrons in China. *Microb Drug Resist*. 00(00):mdr.2018.0229.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) [Internet]. 2018. Bangkok. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo; [updated 2018 Ene 30; cited 2020 Nov 20]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>
- Pachay S. 2018. Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico "Dr. Julio Villacreses Colmont Solca", Portoviejo. *Univ y Soc*. 10(3):134–141.
- Pasteran F, Gonzalez L, Albornoz E, Bahr G, Vila A, Corso A. 2016. Triton Hodge test: improved protocol for modified Hodge test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers. *J Clin Microbiol* 54:640–649. doi:10.1128/JCM.01298-15.
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo J, Nordmann P. 2000. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid and Integron Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 44: 891-897.
- Promega C. 2010. Isolation of Genomic DNA from Whole Blood Wizard® Genomic DNA Purification Kit. :1123–1126.
- Ranjbar R, Ardashiri M, Samadi S, Afshar D. 2018. Distribution of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) among salmonella serogroups isolated from pediatric patients. *Iran J Microbiol*. 10(5):294–299.

- Rivera M, Rodriguez C, Flores R, Serquén L, Arce Z. 2015. Betalactamasas De Espectro Extendido Tipo Tem. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 32(4):752–755.
- Rivoarilala OL, Garin B, Andriamahery F, Collard JM. 2018. Rapid in vitro detection of CTX-M groups 1, 2, 8, 9 resistance genes by LAMP assays. *PLoS One*. 13(7):1–15.
- Rossolini G, Andrea M, Mugnaioli C. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum betalactamases. 14:33–41.
- Seiffert S, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. 2014. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*. 44(3):260–262.
- Shah K, Shrimali G, Mulla S. 2016. Comparison of double disc diffusion method and VITEK 2 compact system to screen the esbl producers in intensive care unit in hospital. 7(9):7–9.
- Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi S, Kamal M. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*. 22(1):90–101.
- Sidjabat H, Paterson D. 2015. Multidrug-resistant *Escherichia coli* in Asia: Epidemiology and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 13(5):575–591.
- Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. 2010. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: Molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol Rev*. 34(3):295–316.
- Supliguicha M, Supliguicha P, Ortega V, Pacurucu C, Lema J, Santander P, Delgado C, León V, Bermeo H, Peñafiel E, et al. 2017. Factores de riesgo para la infección del tracto urinario por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido Resumen Risk factors for infection of urinary tract by extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae. 36.
- Villar H, Jugo M, Macan A, Visser M, Hidalgo M, Maccallini G. 2014. Frequency and antibiotic susceptibility patterns of urinary pathogens in male outpatients in Argentina. *J Infect Dev Ctries*. 8(6):699–704.
- Villegas M, Pallares C, Escandón K, Hernández C, Correa A, Álvarez C, Rosso F, Matta L, Luna C, Zurita J, et al. 2016. Characterization and clinical impact of bloodstream infection caused by carbapenemase-producing enterobacteriaceae in seven Latin American countries. *PLoS One*. 11(4):1–13.
- Woerther P, Andremont A, Kantele A. 2017. Travel-acquired ESBL-producing Enterobacteriaceae: impact of colonization at individual and community level. *J Travel Med*. 24(1):S29–S34.
- Yigit H, Queenan A, Anderson G, Domenech A, Biddle J, Steward C. 2001. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of. *Society*. 45(4):1151–1161.
- Zeng X, Lin J. 2013. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol*. 4(MAY):1–9.
- Zurita J, Alcocer I, Ortega-paredes D, Barba P, Yauri F. 2013. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. *J Glob Antimicrob Resist*. 1(February 2018):6–8.