



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Análisis Clínicos

Laboratorio de Bioinorgánica Aplicada, ICUAP
Laboratorio de Investigaciones Nefrourológicas

Tesis profesional

para obtener el título de Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de vanadio (V) en cepas provenientes de comunidades intracelulares bacterianas (CIB)

Presenta:

pQFB. Irma Guadalupe Gordillo Rodríguez

Director de Tesis:

M.C. José Ángel Francisco Flores Hernández

Co-Director:

D.C. Enrique González Vergara



Abril 2019



Puebla, Pue. a 15 de Noviembre de 2017
BUAP

**C. GORDILLO RODRIGUEZ IRMA GUADALUPE
P R E S E N T E**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Area de Análisis Clínicos,

MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ, Director de Tesis,

DC. ENRIQUE GONZALEZ VERGARA, Asesor,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de vanadio (V) en cepas provenientes de comunidades intracelulares bacterianas (CIB)

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales a los que haya lugar

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR



80 AÑOS
DE UNIVERSIDAD

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



BUAP

Puebla, Pue. a 22 de Noviembre de 2017

DR. SAMUEL TREVIÑO MORA

MC. LAURA MARTÍNEZ PÉREZ

MC. EDUARDO SANCHEZ LARA

Con toda atención comunico a Uds. que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora de Tesis que presenta el (la) Pasante de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

GORDILLO RODRIGUEZ IRMA GUADALUPE

cuyo título es :

Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de vanadio (V) en cepas provenientes de comunidades intracelulares bacterianas (CIB)

Realizada en el Area de Análisis Clínicos;

asimismo, les ruego que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR



C.c.p. Archivo

80 AÑOS
DE UNIVERSIDAD

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



BUAP

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PRESENTE

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno de la carrera de QUÍMICO FARMACOBIOLOGO **GORDILLO RODRÍGUEZ IRMA GUADALUPE**

realizada en el área de Análisis Clínicos, comunican a Ud. la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de vanadio (V) en cepas provenientes de comunidades intracelulares bacterianas (CIB)

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los 22 días del mes de Marzo de 2019

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"


DR. SAMUEL TREVIÑO MORA


MC. LAURA MARTÍNEZ PÉREZ


MC. EDUARDO SANCHEZ LARA



C.c.p. Archivo

Vo.Bo.


Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



MTRA. MARIA ELENA RUIZ VELASCO
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
PRESENTE

En relacion al oficio de fecha 22 de Marzo de 2019, signado por el Coordinador del Departamento de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

GORDILLO RODRIGUEZ IRMA GUADALUPE

JURADO

DR. SAMUEL TREVIÑO MORA
MC. LAURA MARTÍNEZ PÉREZ
MC. EDUARDO SANCHEZ LARA

Examen que se realizará el día 3 de Abril de 2019, a las 18:00 horas en el SALON DE USOS MULTIPLES.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 22 de Marzo de dos mil diecinueve


DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR



C.c.p. Archivo

RESUMEN

Algunos uropatógenos causantes de infecciones de tracto urinario (ITU's), dentro de sus factores de virulencia tienen la capacidad de formar comunidades intracelulares (CIB's), y presentar resistencia a los antimicrobianos; esto hace más complicada la elección del tratamiento, por lo que la generación de nuevos antibióticos es necesaria. En este estudio se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI), de sales de decavanadatos de sodio, NaV_{10} , (7.8-500 μM), amonio, NH_4V_{10} , (3.2-200 μM) y metformina, MetfV_{10} (7.8-500 μM), frente a 15 cepas clínicas aisladas de CIB's: 3 Enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* y *Enterobacter sp.*), *S. aureus* y *Enterococcus sp.*, y a 2 cepas de referencia: *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213. Los resultados muestran que los tres decavanadatos no inhibieron el crecimiento bacteriano de las cepas clínicas de enterobacterias y de *S. aureus*, y tampoco para la cepa de *E. coli* ATCC 25922, a concentraciones de 200 μM y 500 μM respectivamente. Por otra parte, MetfV_{10} genero inhibición bacteriana a 125 μM para *S. aureus* ATCC 29213 y de 62.5 y 125 μM para *Enterococcus sp.* Con NaV_{10} se obtuvo inhibición a 500 μM para *S. aureus* ATCC 29213 y de 125 y 250 μM para *Enterococcus sp.* Con NH_4V_{10} se obtuvo inhibición a 200 μM para *S. aureus* ATCC 29213 y de 100 y 200 μM para *Enterococcus sp.* Sin embargo, las CMI's observadas son mayores a la concentración máxima administrable de V en humanos (10 μM). Por lo que no tendrían efecto biológico a concentraciones administrables.

Índice

CAPÍTULO 1	1
1. Marco teórico	1
1.1 Vanadio	1
1.2 Especiación	2
1.3 Vanadio en medicina	4
1.4 Toxicidad del vanadio	6
1.5 Infecciones del tracto urinario	7
1.6 Mecanismos de patogenicidad de los uropatógenos	7
1.7 CIB's y la cascada uropatogénica	8
1.8 ITU's y la resistencia a los antimicrobianos	10
1.9 Antibióticos, mecanismo de acción y mecanismo de resistencia	11
1.10 Métodos de determinación de sensibilidad antimicrobiana	12
CAPÍTULO 2	14
2.1. Definición del problema	14
2.2. Justificación	15
2.3. Objetivos	16
2.4. Hipótesis	17
CAPÍTULO 3	18
3.1. Diseño de la investigación	18
3.2. Diagrama de trabajo	20
CAPÍTULO 4	22
4. Materiales y métodos	22
4.1 Metodología para la síntesis de decavanadatos	22
4.2 Caracterización de decavanadatos	23
4.3 Metodología para el aislamiento de bacterias provenientes de CIB's	24
4.4 Metodología para la identificación de bacterias provenientes de CIB's	25
4.5 Nomenclatura cepario	25

4.6 Metodología para establecer el pH óptimo de actividad antimicrobiana de decavanadatos	27
4.7 Metodología para determinar la CMI por microdilución	29
CAPÍTULO 5	34
5. Resultados	34
5.1 Síntesis de decavanadatos	34
5.2 Caracterización de decavanadatos	34
5.3 Aislamiento e identificación de bacterias provenientes de CIB's	36
5.4 Determinación del pH óptimo de actividad antimicrobiana de decavanadatos	40
5.5 Determinación de CMI	42
CAPÍTULO 6	47
6. Discusión de resultados	47
CAPÍTULO 7	56
7.1 Conclusiones	56
7.2 Perspectivas	57
8. Referencias	58
9. Anexos	71
9.1 Protocolo de aislamiento de CIB's [LINU 2016]	71
9.2 Identificación de bacterias en CHROMagar orientación	73
9.3 Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias	74
9.4 Tinción de Gram	78
9.5 Identificación bacteriana en Medio MacConkey	80
9.6 Prueba de catalasa	81
9.7 Espectros infrarrojo de MetfV ₁₀ y CitV ₁₀ .	82
9.8 Criterios de calidad para la determinación de CMI en <i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>S. aureus</i> ATCC 29213/ Criterios de sensibilidad y resistencia en <i>Enterobacterias</i> , <i>Staphylococcus sp.</i> y <i>Enterococcus sp.</i>	83
9.9 Concentraciones de antibióticos en µg/ml y su equivalencia en µM.	84

Abreviaturas

ABC: ATP-binding cassette
ABU: Bacteriuria asintomática
AC3: Adenil ciclase tres
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADP: Adenosín difosfato
AMK: Amikacina
AMP: Ampicilina
AMPc: AMP cíclico
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
ATCC: American Type Culture Collection
ATP: Adenosín trifosfato
BD: Becton Dickinson
BEOV: bis(etilmaltolato)oxovanadio(IV)
BHI: Infusión cerebro corazón
Ca: Calcio
CDC: Centro de Control y Prevención de Enfermedades
CIB: Comunidad intracelular bacteriana
CitV₁₀: Decavanadato de citosinio
CLSI: Instituto de normas clínicas y de laboratorio
CMI: Concentración mínima inhibitoria
CN: Control negativo
CNF1: Factor necrotizante citotóxico uno
CP: Control positivo
CRO: Ceftriaxona
Cu: Cobre

DL50: Dosis letal cincuenta

ECF: Energy-coupling factor

EGO: Examen General de Orina

ESBL: Betalactamasas de espectro extendido

g: gramos

GLASS: Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos

HlyA: Alfa hemolisina

ICUAP: Instituto de Ciencias BUAP

IgA: Inmunoglobulina A

IR: Infrarrojo

ITU: Infección del tracto urinario

Leu: Leucocitos

LINU: Laboratorio de investigaciones nefrourológicas

L: Litro

MHA: Agar Mueller-Hinton

MDR: Multiresistentes a medicamentos

Metf: Metformina

MetV₁₀: Decavanadato de metforminio

Mg: Magnesio

mg: miligramo

mL: mililitro

mM: milimolar

MMR: Mismatch repair

Mo: Molibdeno

NaV₁₀: Decavanadato de sodio

NBD's: Dominios de unión a nucleótidos

NH₄V₁₀: Decavanadato de amonio

NOM: Norma oficial mexicana

O: Oxígeno

PIGR: Receptor de inmunoglobulina polimérico

POM's: Polioxometalatos

P.S.B: Precipitación de sales biliares

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

QIR: Reservorios Intracelulares Quiescentes

RAM: Resistencia a los Antimicrobianos

ROS: Especies reactivas de oxigeno

SSI: Solución salina isotónica

TGH: Transferencia genética horizontal

TMD's: Dominios transmembrana

TSB: Caldo Soya Trypticaseina

UPEC: *Escherichia coli* uropatogénica

V: Vanadio

V₁₀: Decavanadato

VBNC: Viable pero no cultivable

μL: micro litro

μm: micra

μM: micro molar

Fórmulas

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$: Etanol

$\text{CH}_3\text{-COOH}$: Ácido acético

$(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_3\text{O})_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28})\cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Decavanadato de citosinio tetrahidratado

$(\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O})_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28})\cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Decavanadato de metforminio hexahidratado

HCl : Ácido Clorhídrico

K^+ : Ion Potasio

Na^+ : Ion Sodio

NaOH : Hidróxido de sodio

NaVO_3 : Metavanadato de sodio

$(\text{Na})_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28})\cdot 18\text{H}_2\text{O}$: Decavanadato de sodio octadecahidratado

$(\text{NH}_4)^+$: Ion Amonio

NH_4VO_3 : Metavanadato de amonio

$(\text{NH}_4)_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28})\cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Decavanadato de amonio hexahidratado

$(\text{PO}_4)^{-3}$: Ion Fosfato

$(\text{VO}_4)^{-3}$: Ion Vanadato

V_2O_5 : Óxido de vanadio

$(\text{V}_{10}\text{O}_{28})^{-6}$: Ion Decavanadato

Índice de figuras

Figura 1. Representación poliédrica del ion decavanadato.....	2
Figura 2. Especies de V^{+5} y su distribución a diferentes pH.....	3
Figura 3. Similitudes y diferencias entre vanadato y fosfato.....	4
Figura 4. Cascada uropatogénica.....	10
Figura 5. Aislamiento de CIB's.....	24
Figura 6. Nomenclatura desarrollada para cepas aisladas de CIB's	26
Figura 7. Placa de micropocillos para la determinación de pH óptimo de actividad antimicrobiana de decavanadatos.....	29
Figura 8. Preparación de pocillos para la determinación de CMI.....	32
Figura 9. Confirmación de CMI.....	33
Figura 10. Espectros IR de los compuestos $(C_4H_6N_3O)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 6H_2O$ y $(C_4H_6N_3O)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 4H_2O$	35
Figura 11. Identificación bacteriana en CHROMagar orientación para urocultivo.....	38
Figura 12. Etiología de cepas provenientes de CIB's.....	39
Figura 13. pH óptimo de actividad antimicrobiana de decavanadatos.....	41
Figura 14. Sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia de cepas aisladas de CIB's a ampicilina, ceftriaxona y amikacina.....	44

Índice de tablas

Tabla 1. Nomenclatura de cepas por abreviaturas.....	25
Tabla 2. Características de cristales de decavanadatos.....	34
Tabla 3. Cepas seleccionadas para la determinación de CMI.....	42
Tabla 4. Porcentaje de resistencia a los antibióticos por tipo de cepa.....	45
Tabla 5. CMI de decavanadatos.....	46

CAPÍTULO 1

1. Marco teórico

1.1 Vanadio

El vanadio (V) fue descubierto por primera vez en 1801 por el científico español Andrés Manuel del Río, en Zimapán, municipio del actual estado de Hidalgo, México. El segundo y oficial descubrimiento fue hecho por el químico Sueco Gabriel Nils Sefström en 1830 quien lo nombró vanadio en honor de *Vanadis*, un epíteto de Freyja, diosa nórdica de la belleza y fertilidad, esto debido a la variedad de colores que aparecen en sus soluciones ante cambios en el estado de oxidación.¹⁻³.

El V (número atómico 23), es un elemento que pertenece a la primera serie de los metales de transición. Tiene una masa atómica relativa de 50.95 g/mol, densidad de 6.11 g/cm³, punto de fusión de 1950°C, punto de ebullición de 3600°C y dos isotopos estables: ⁵⁰V y ⁵¹V, los cuales presentan una abundancia isotópica de 0.25% y 99.75% respectivamente. Además, muestra una variedad de estados de oxidación que van desde +1 a +5, siendo el pentóxido de vanadio (V₂O₅) una de las formas más comunes²⁻⁵.

En solución acuosa es posible que se lleve a cabo la formación de estructuras más complejas como el ion decavanadato, (V₁₀O₂₈)⁻⁶ (V₁₀), el cual pertenece a la familia de los polioxometalatos (POM's) y está conformado por diez átomos de V reunidos en una estructura compacta y rodeados cada uno por seis átomos de oxígeno con una carga formal de -6 (Figura 1)^{6,7}.

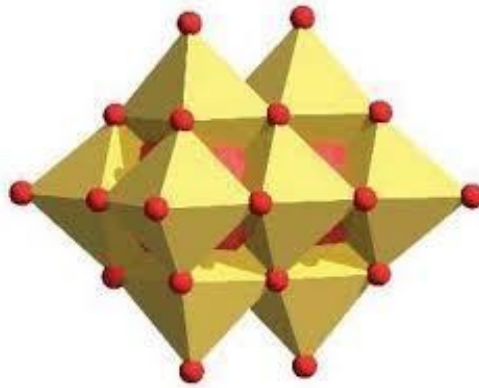


Figura 1. Representación poliédrica del ion decavanadato. Las esferas rojas representan átomos de oxígeno (Tomada de Aureliano, 2017).

1.2 Especiación

El estudio de compuestos basados en metales se ha incrementado desde hace décadas En donde, además de analizar la estructura molecular o el umbral toxicológico, también se analizan los posibles efectos benéficos que estos compuestos puedan tener en el cuerpo humano, principalmente en el tratamiento de enfermedades.⁸⁻¹⁰ Se ha descrito que la actividad biológica de los metales es dependiente de la especie que se encuentre presente en el sistema biológico.¹¹⁻¹³

La especiación es un término que define la distribución de un componente entre diferentes especies químicas presentes en un sistema¹⁴. La especiación del V es sensible a hidrólisis y a cambios en el estado de oxidación. El V puede existir en diversos estados de oxidación, los más comunes en sistemas biológicos son V^{+4} y V^{+5} , los cuales forman una variedad de especies en solución acuosa. Así, V^{+4} se oxida a V^{+5} cuando el pH es menor a 4.0. El ion V^{+5} es estable a reacciones de óxido reducción a cualquier pH, sin embargo, puede ser reducido a V^{+4} por la presencia de reductores biológicos, como el glutatión (GHS)^{13,15}.

El vanadato $(VO_4)^{-3}$ en solución acuosa puede formar una variedad de oxovanadatos, tales como el vanadato monomérico, dimérico, tetramérico o

pentamérico. Sin embargo, cuando se encuentra en medio ácido, predomina la especie decamérica (Figura 2)¹⁵.

En sistemas biológicos, las especies de V pasan por diferentes fluidos con diferente pH y en presencia de proteínas que fungen como ligantes, lo que propicia mayor susceptibilidad a una modificación de la especie de vanadio que se encuentre en el medio¹⁵. En humanos, el V puede entrar al sistema mediante inhalación o por vía oral. Una vez ingerido, los compuestos de V⁺⁵ son parcialmente reducidos en estómago, sin embargo, el V₁₀ puede mantenerse en su forma diprotonada, por el rango de pH del medio (1.0-3.2), y en su forma protonada en duodeno y yeyuno en los que se encuentra pH de 5.0 a 7.0¹⁶. Por esta razón los estudios de especiación juegan un papel importante en el desarrollo de compuestos terapéuticos.

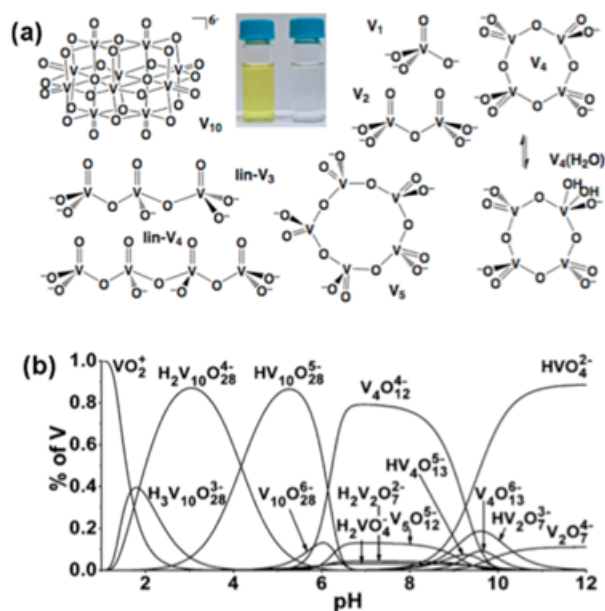


Figura 2. Especies de V⁺⁵ y su distribución a diferentes pH. a) Ilustración esquemática de las especies V⁺⁵ aniónicas. b) Distribución de especies en una solución de V⁺⁵ 200 mM (Tomada de Crans *et. al.*, 2013).

A partir del conocimiento de especiación, se han realizado experimentos con peces como modelo de estudio, en los que su temperatura fisiológica (20°-22°C) le brinda mayor estabilidad al V₁₀¹¹. Así disminuyen las variables que

puedan intervenir en la determinación de los efectos que reflejen los compuestos de V (diferenciar los efectos de las especies decaméricas de las monoméricas).

1.3 Vanadio en medicina

El ion $(VO_4)^{-3}$ es estructuralmente análogo al fosfato, $(PO_4)^{-3}$, por lo tanto, el $(VO_4)^{-3}$ tiene un papel general en procesos fisiológicos en donde se ve implicado el ion $(PO_4)^{-3}$. Por ejemplo, el $(VO_4)^{-3}$ sustituye al $(PO_4)^{-3}$ en fosfatasas y quinasas. Sin embargo, a diferencia del $(PO_4)^{-3}$, el $(VO_4)^{-3}$ forma enlaces estables de coordinación mientras que en el $(PO_4)^{-3}$ los enlaces se presentan únicamente en el estado de transición (Figura 3)¹⁷. Debido a esta similitud, la búsqueda en el uso médico de $(VO_4)^{-3}$ en procesos donde el $(PO_4)^{-3}$ se ve implicado es importante.

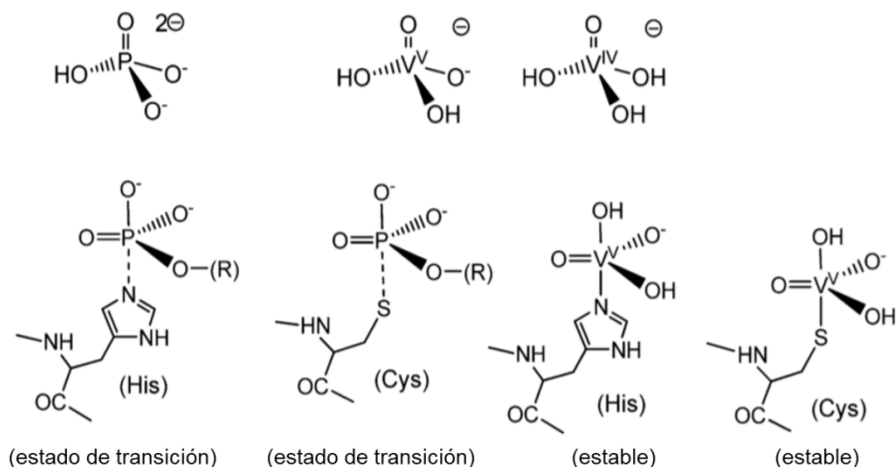


Figura 3. Similitudes y diferencias entre vanadato y fosfato. a) Los estados de protonación predominantes del $(PO_4)^{-3}$ y del $(VO_4)^{-3}$ (V) y (IV) a pH neutro. b) Especies penta-coordinadas que evolucionan a partir de la interacción entre $(PO_4)^{-3}$ (y ésteres de fosfato) o residuos de proteínas con péptidos: el $(PO_4)^{-3}$ solo forma estados de transición lábiles, simbolizados aquí por un enlace PN discontinuo a histidina o un enlace PS a cisteinato, mientras que $(VO_4)^{-3}$ forma complejos estables. Algunos ejemplos son la unión de $(VO_4)^{-3}$ a un residuo de histidina y la coordinación de $(VO_4)^{-3}$ a un residuo de cisteinato (Tomada de Rehder, 2015).

Los compuestos de V han sido candidatos para el tratamiento de diferentes enfermedades, principalmente donde el V se encuentra en estado de oxidación +4 o +5. Este elemento ha sido reconocido principalmente por su actividad antidiabética en estudios con modelos murinos¹⁸. El compuesto bis(2-etil-3-hidroxi-4-piridonato) oxovanadio (IV) (BEOV) ha sido uno de los principales compuestos de referencia para observar el efecto hipoglucemiante de compuestos de V¹⁶. En estudios con ratas, Yarola *et al.*, observaron el efecto insulinomimético del V en su forma decamérica, $(C_7NH_{10})_6(V_{10}O_{28}) \cdot 2H_2O$ ¹⁹. A su vez, Treviño *et al.*, observaron el efecto hipoglucemiante y regulador metabólico del V₁₀ asociado a metformina, $(H_2Metf)_3(V_{10}O_{28}) \cdot 8H_2O$ ¹⁰.

Por otra parte también se han realizado estudios con oxovanadio (IV) como agentes para el tratamiento de Leucemia. Dong *et al.*, y Narla *et al.*, observaron actividad citotóxica en leucemia linfoblástica aguda^{20,21} y Rosu *et al.*, en leucemia promielocítica²².

El V₁₀ ha sido uno de los principales compuestos para el estudio como agentes anticancerígenos⁶. Zai *et al.*, observaron actividad citotóxica con V₁₀ asociado a trietilenetilendiaminopiridina, $(C_6H_{18}N_2)_3(V_{10}O_{28}) \cdot 6H_2O$ y etilendiaminopiridina, $(C_2H_{10}N_2)_3(V_{10}O_{28}) \cdot 2H_2O$ ²³.

El V, también ha sido probado para el tratamiento de tuberculosis. Maia *et al.*, trabajaron en la síntesis de diferentes compuestos asociados a oxovanadio (IV) y *cis*-dioxovanadio (V), por otro lado, Correia *et al.*, formaron POM's con V⁺⁴ y V⁺⁵. Ambos grupos de investigación trabajaron con una cepa ATCC de *Mycobacterium tuberculosis* para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos sintetizados y así comprobar su efecto antimicrobiano^{24,25}. Existen otros estudios sobre el efecto antimicrobiano que el V puede ejercer en diferentes microorganismos. En estudios con parásitos se observó efecto inhibitor de oxovanadios en *Leishmania terantolae*

ATCC30143²⁶ y de un compuesto formado con dioxovanadio (IV) en *Entamoeba histolytica* HM1:1MSS^{27,28}.

Se ha trabajado con complejos de oxovanadios (IV) como agentes antifúngicos, Maqsood *et al.*, determinaron su CMI en *Aspergillus flavus*, *Trichophyton longifusus*, *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Fusarium solani* y *Candida glabrata*²⁹. Posteriormente Sahani *et al.*, determinaron la CMI de oxovanadios (IV) en *Aspergillus niger*, *Colletotrichum falcatum* y *Curvularia pallescens*³⁰. Como agente antibacteriano se han realizado estudios *in vitro* con oxovanadio y V₁₀ por CMI y difusión con sensidisco en bacterias Gramnegativas y Grampositivas como modelos de estudio³¹⁻³³. De estos estudios se ha previsto la importancia de estos compuestos como posibles fuentes alternativas a tratamiento en infecciones bacterianas.

1.4 Toxicidad del vanadio

Los compuestos de V son generalmente tóxicos, esto incrementa con el estado de oxidación en que esté presente, siendo el vanadio pentavalente (V⁺⁵) el de mayor toxicidad; sin embargo, los efectos y el grado de toxicidad son vía/dosis dependiente^{16,34-37}.

En algunos experimentos con modelos animales se han descubierto diferentes signos toxicológicos ocasionados por la ingesta de V. En ratas se asocia daño al sistema nervioso central por desmielinización tras la administración de 1-25 mg de V por vía intraperitoneal, en donde se advierte una modificación en el desarrollo físico y neuronal de neonatos al consumir V presente en leche materna³⁴.

De acuerdo con resultados obtenidos en estudios con peces, la administración de V genera un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno, (ROS, por sus siglas en inglés), lipoperoxidación e inhibición de contracción

muscular por interacciones de tipo vanadio-actina, vanadio-miosina, vanadio-bomba de calcio en retículo sarcoplásmico^{11,35}.

La toxicidad del V en humanos se presenta en los sistemas circulatorio, respiratorio, digestivo y nervioso central, además de causar daño en riñones y piel. Para que la intoxicación por V sea diagnosticada es necesaria su cuantificación en sangre y orina. No obstante, también puede ser diagnosticada en base a la clínica del paciente, presentado síntomas como tos, esputo, disnea, irritación de ojos, nariz y oído, cefalea, taquicardia, hipertensión, hepatomegalia, temblor en manos y lengua de coloración verdosa. Cada uno de los síntomas se verá más acentuado acorde a la vía de exposición^{36,37}.

A pesar de que no hay reporte de la dosis letal 50 (DL50) en humanos por consumo de V, existe un caso reportado de un paciente con 6.22 mg/L en sangre (*post mortem*), que fallece después de 24 horas de exposición al V³⁸.

1.5 Infecciones del tracto urinario

La infección del tracto urinario (ITU) es un término que se aplica a una amplia variedad de condiciones clínicas que van desde la bacteriuria asintomática (ABU por sus siglas en inglés) hasta la bacteremia³⁹. Las ITU's son una de las primeras causas de infecciones por bacterias en humanos, particularmente en países en desarrollo, afectando 150 millones de personas al año en todo el mundo, reflejando alto rango de morbilidad, lo que resulta en 6 mil millones de dólares en gasto sanitario⁴⁰⁻⁴². La incidencia de ITU's es más común en mujeres (53.3%) que en hombres (46.7%), y aún mayor en mujeres sexualmente activas entre 21 y 30 años (27%)⁴³. Las ITU's son causadas por un amplio rango de patógenos que incluyen bacterias Gramnegativas y Grampositivas e incluso estructuras fúngicas^{41,44}. Los organismos patógenos más comunes hallados son: *Escherichia coli* (71.4%), *Klebsiella pneumoniae* (10.8%) y *Proteus sp.* (7.6%)^{41,44}.

1.6 Mecanismos de patogenicidad de los uropatógenos

Uno de los fenotipos de *E. coli* que afecta al tracto urinario es *E. coli* uropatógena (UPEC), asociado a las ITU's complicadas por la variedad de factores de virulencia que posee, incluyendo: adhesinas, flagelos, síntesis de toxinas, invasinas y transportadores de proteínas⁴⁵. No obstante, una sola bacteria puede replicar en 10^4 o más bacterias en cuestión de horas después de la invasión, siendo protegida de la respuesta inmune innata del huésped gracias a la formación de biofilm extracelular o intracelular, mejor conocido como comunidades intracelulares bacterianas (CIB)⁴⁶. Por otro lado, uno de los factores de virulencia que desarrolla UPEC es la expresión de una amplia gama de genes de resistencia a diversos antibióticos, importante por el reciente aumento en la tasa de aparición de cepas multiresistentes a los medicamentos (MDR) en todo el mundo como una amenaza para el resultado favorable de infecciones comunes en la comunidad y el entorno hospitalario⁴⁷.

1.7 CIB's y la cascada uropatogénica

Durante una infección aguda, UPEC es capaz de invadir la superficie de epitelio internándose en la célula vía TLR-4. Sin embargo, en algunas ocasiones la bacteria escapa de los endosomas hacia el citoplasma para replicarse, formando CIB's. La formación de estas estructuras se ha descrito mediante la cascada uropatogénica la cual conlleva una serie de pasos que abarcan desde la adherencia bacteriana a las células de urotelio, hasta la exfoliación o lisis de las células que han sido invadidas⁴⁸.

Para que la cascada uropatogénica se lleve a cabo, la adherencia es un paso crucial, esto evita que las células sean eliminadas por arrastre al momento de la micción. La internalización bacteriana las provee de un ambiente rico en nutrientes al mismo tiempo que son protegidas por la respuesta inmune innata.

Por otro lado, dicha internalización protege a las bacterias intracelulares de la exposición a antibióticos permitiendo su supervivencia⁴⁸.

Para el mejor estudio de este fenómeno, se han descrito tres diferentes estadios: estadio temprano (formación de CIB), después de la adherencia e internalización, UPEC se replica rápidamente en tiempos de 30 a 35 minutos conservando su forma bacilar inicial de $\leq 3 \mu\text{m}$. Entre las 6-8 horas de infección UPEC disminuye su tiempo de replicación a 60 minutos, cambiando su morfología bacilar a cocoide ($0.7 \mu\text{m}$) empaquetándose y formando pequeñas comunidades, logrando llevar a cabo la maduración de CIB conocida como estadio intermedio. Finalmente, en el estadio tardío después de las 12 horas de infección, UPEC es capaz de disociarse de urotelio lisando las células y promoviendo su flujo hacia el lumen de la vejiga provocando bacteriuria, permitiendo con ello su esparcimiento, infectando células vecinas, reiniciando y haciendo perenne la cascada uropatogénica (Figura 4)⁴⁸⁻⁵⁰.

Para que se lleve a cabo la cascada uropatogénica, son necesarios ciertos factores de virulencia, los cuales desencadenarán una serie de reacciones moleculares. Entre estos, UPEC cuenta con un Pili específico conocido como Pili tipo 1 el cual se encuentra asociado con la adhesina FimH, esta a su vez es capaz de reconocer uroplaquinas manosiladas y alfa-beta-integrinas, presentes en la membrana de urotelio, para iniciar la colonización e invasión en la superficie celular⁴¹.

La interacción del Pili tipo 1 con el urotelio promueve la activación de Rho GTPasas, como aquellas pertenecientes a la familia RAC, causando una modificación estructural en los filamentos de actina internalizando la bacteria. Sin embargo, existe un mecanismo de defensa que promueve la expulsión de UPEC hacia el lumen; vía dependiente de TLR-4 expresado en urotelio. TLR-4 es activado tras la interacción con un lipopolisacárido liberado por UPEC, induciendo una mayor producción de AMP cíclico (AMPC), por activación de

adenil ciclasa 3 (AC3), resultando en la exocitosis bacteriana. UPEC tiene la capacidad de evadir este sistema de defensa saliendo hacia el citoplasma donde se replica rápidamente realizando interacciones célula-célula originando otras CIB's⁴¹.

Estas comunidades se encuentran protegidas del sistema inmune del huésped, desarrollando resistencia a los antibióticos. Así un cuadro agudo llega a ser tratado satisfactoriamente, o UPEC puede causar infecciones persistentes invadiendo células intermedias, formando reservorios intracelulares quiescentes (QIR por sus siglas en inglés). Este tipo de bacterias no se replican, sin embargo, son capaces de sobrevivir por meses incluso después de que el huésped se encuentre en tratamiento con antibióticos. Este tipo de reservorios son entonces una clave importante en el desarrollo de infecciones recurrentes y cuadros de cistitis crónica⁵¹.

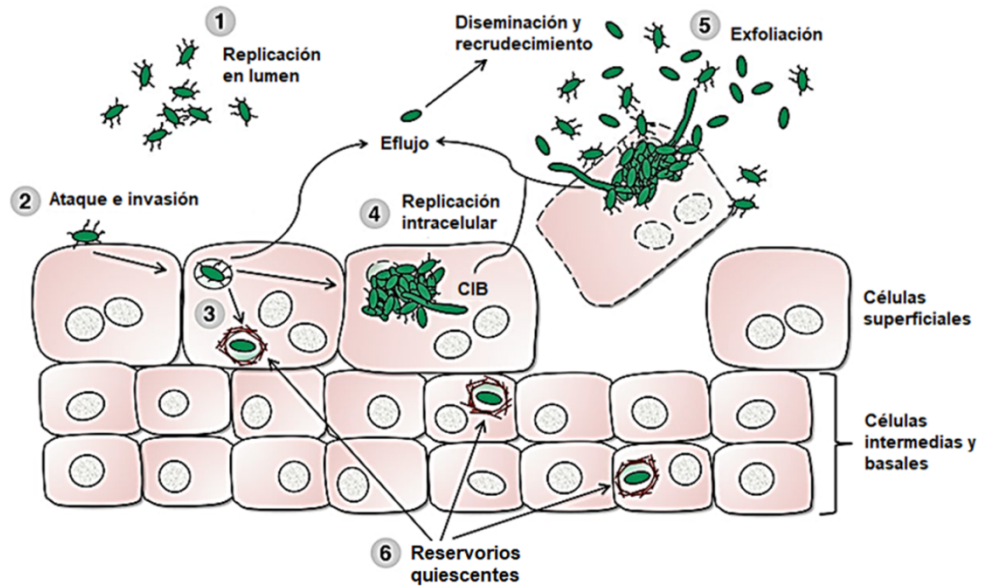


FIGURA 4. Cascada uropatogénica. 1) Durante una ITU, UPEC (verde) puede replicarse dentro del lumen de la vejiga o 2) unirse a e invadir las células epiteliales de la vejiga. 3) Después de la invasión, UPEC es llevada de regreso a la luz o traficada hacia compartimentos tardíos similares a endosomas. 4) La interrupción de estos compartimentos y la posterior entrada de UPEC en el citosol del huésped permite un rápido crecimiento bacteriano intracelular y el desarrollo de una comunidad intracelular bacteriana (CIB). 5) La infección puede desencadenar la exfoliación de las células de la vejiga, un proceso que ayuda en la eliminación de bacterias adherentes e internalizadas. El flujo de salida de UPEC de las células de vejiga del huésped, incluidas las que se someten a exfoliación, facilita la diseminación de patógenos dentro y entre los huéspedes. 6) UPEC que permanece unida dentro de los compartimentos similares a endosomas tardíos en el urotelio puede establecer reservorios inactivos intracelulares de larga vida que a menudo se enredan dentro de los filamentos de actina (rojo) y son extremadamente difíciles de erradicar con tratamientos con antibióticos. El resurgimiento de UPEC de estos reservorios puede iniciar infecciones recurrentes (Tomada de Barber *et. al.*, 2013).

1.8 ITU's y la resistencia a los antimicrobianos

Las ITU's, al ser la tercera causa de morbilidad en México⁵², han sido una de las principales causas del uso indiscriminado de antibióticos generando una alta resistencia a los antibióticos en bacterias Gramnegativas tales como *K. pneumoniae* y UPEC, donde esta última reporta más del 50% de resistencia a ampicilina (77%), tetraciclina (60.3%), amoxicilina (59%), cotrimaxol (58.3%),

piperacilina (55.8) y norfloxacino (53.2%). Por otra parte, otros factores de virulencia aumentan la resistencia, por ejemplo, la capacidad de formar biofilm por UPEC incrementa la resistencia de 31.8 a 75.0%, en antibióticos como norfloxacino⁵³. La capacidad de ser productoras de amplio espectro de β -lactamasas (ESBL) está estrechamente ligado a la capacidad bacteriana de formar biofilm, así UPEC ESBL incrementa la resistencia a norfloxacino hasta en un 66.6%, en otro caso se encuentra cefepime en el que cepas no productoras de ESBL presentan el 0.1% de resistencia mientras, aquellas productoras aumentan su resistencia hasta el 77.5%^{53,54}.

K. pneumoniae también tiene la capacidad de producir ESBL, con un porcentaje general de resistencia a ciprofloxacino de 11.6%, las cepas no productoras de ESBL 3.6% y aquellas que si son productoras 81.2%. Si a esto se le añade que las cepas productoras de ESBL se encuentran en un 10.3% de los aislamientos, la atención hacia el fenómeno de resistencia es mayor⁵⁴.

1.9 Antibióticos, mecanismo de acción y mecanismo de resistencia

Los antibióticos son sustancias químicas que presentan actividad antimicrobiana⁵⁵. Los antibióticos se pueden clasificar en aquellos que provocan la muerte celular (bactericidas) y los que inhiben el crecimiento celular (bacteriostáticos). Así como el efecto que producen, los antibióticos también se clasifican de acuerdo al sitio blanco de acción⁵⁶. Entre los antibióticos y su mecanismo de acción, podemos encontrar a los inhibidores de la síntesis de pared como los β -lactámicos, grupo formado por penicilinas, cefalosporinas, monobactams y carbapemems⁵⁷. También se encuentran los antibióticos cuyo mecanismo de acción es mediante la alteración de la integridad de la membrana plasmática de los cuales se pueden encontrar a las polimixinas. Por otro lado, están los inhibidores de la síntesis de proteínas representados por aminoglucósidos y macrólidos. Finalmente se encuentran a los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos como las quinolonas y rifampicina⁵⁶⁻⁵⁸.

En décadas anteriores, los antibióticos fueron conocidos como medicina milagrosa debido a que, desde su invención, millones de vidas fueron salvadas, aumentando la esperanza de vida de las personas, de infantes quienes morían por infecciones que en su momento no tenían cura. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos medicamentos ha provocado el desarrollo continuo de un fenómeno del que no se había percatado previamente, la resistencia a los antibióticos, en el que estos ya no son eficaces en el tratamiento de una extensa variedad de enfermedades, debido a que ya no son capaces de eliminar las bacterias causantes⁵⁹.

Las bacterias pueden expresar la resistencia a los antibióticos mediante diversos mecanismos: producción de enzimas que modifican el sitio activo de los antibióticos, cambios en la permeabilidad de su membrana, síntesis de bombas de eflujo para la expulsión de antibióticos, cambios en el sitio blanco del antibiótico y sobre expresión de estos sitios^{57,60,61}.

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) puede llevarse a cabo mediante la transferencia de material genético, que contiene los genes de resistencia, entre bacterias. Existen dos tipos de transferencia de genes; la transferencia genética vertical, la cual se lleva a cabo mediante la transferencia de genes de una célula madre a una célula hija y generalmente se da en la etapa de crecimiento y la transferencia genética horizontal (TGH) que se presenta cuando una bacteria le transfiere material genético a otra ya sea de su mismo género o con bacterias pertenecientes a otros géneros⁶²⁻⁶⁴.

1.10 Métodos de determinación de sensibilidad antimicrobiana

La sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos se realiza *in vitro* mediante métodos fenotípicos (dilución o difusión con discos), se fundamentan en el enfrentamiento de un inóculo bacteriano estandarizado a una concentración de un antibiótico determinado. La interpretación de los resultados obtenidos

permite clasificar los microorganismos en sensibles, intermedios o resistentes^{65,66,67}.

Las técnicas de dilución tienen como objetivo la determinación de CMI, definida como la concentración de antimicrobiano mínima que inhibe el crecimiento bacteriano y representa la actividad bacteriostática o capacidad del antimicrobiano de inhibir el crecimiento de las bacterias. Para determinar la CMI se realiza una serie de diluciones en medio líquido (técnica de macrodilución o técnica de microdilución) o en medio sólido (técnica de dilución en agar)^{65,66,67}.

La técnica por difusión con discos emplea discos de papel impregnados con una solución estandarizada del antibiótico, dispuestos sobre la superficie previamente inoculada en su superficie con una suspensión bacteriana. El disco libera, en contacto con el medio sólido el antibiótico, que difunde sobre este generando un gradiente de concentración a su alrededor. En la zona más cercana al disco, la concentración es más elevada y menor en la más alejada. Cuando ésta es superior a la CMI se observa un halo de inhibición alrededor del disco. El diámetro formado está en relación con el grado de sensibilidad o resistencia del microorganismo a la aplicación del antibiótico^{65,67}.

La técnica E-test es un método de difusión que permite la determinación de CMI. Utiliza tiras de plástico impregnadas por un antibiótico en concentraciones decrecientes. Al contacto con el agar, el antibiótico difunde impidiendo el crecimiento bacteriano formando una zona de inhibición en forma de elipse, la CMI corresponde de con el punto de inserción de la elipse y el valor de escala impresa en la superficie de la tira^{65,67}.

CAPÍTULO 2

2.1. Definición del problema

Las ITU's son una de las principales causas de morbilidad a nivel nacional. De acuerdo al Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud, se reportaron 4,098,042 casos en el 2015 y para el 2017 la cifra aumentó a 4,474,599^{52,68-69}. A su vez, la expresión de genes de resistencia de los uropatógenos se ha hecho más evidente⁵⁹. De acuerdo al Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS por sus siglas en inglés), entre las bacterias resistentes más frecuentes son *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*⁷⁰.

En estudios que determinan la resistencia antimicrobiana de uropatógenos, se han encontrado porcentajes de resistencia mayor al 50% y las cepas con capacidad de expresar ESBL, incrementan la resistencia a antibióticos hasta un 80% o más⁵³⁻⁵⁴. A su vez en muchos países no existe regulación en la venta de antibióticos, por lo que su uso llega a ser inadecuado por parte de los pacientes⁷¹. Esto aunado a que, hasta en el 50% de los casos la indicación terapéutica, la elección del antimicrobiano o la duración del tratamiento llega a ser incorrecta⁷¹, provoca el incremento gradual de la resistencia microbiana⁵⁹. Por tal motivo se ha visto en la necesidad de buscar y crear nuevos compuestos que sean capaces de combatir a los microorganismos causantes de estas infecciones.

Por lo anterior se formuló la siguiente pregunta de investigación:

¿El decavanadato de metformino y decavanadato de citosinio tienen actividad antimicrobiana en cepas aisladas de CIB's?

2.2. Justificación

El uso de V como agente antimicrobiano en bacterias, hongos y parásitos ha aumentado paulatinamente por su alta capacidad de formar ROS³³. De acuerdo con estudios antibacterianos con compuestos asociados al V₁₀, este muestra mejor actividad antimicrobiana que incluso aquellos antibióticos de primera elección para el tratamiento de diversas infecciones³².

En ensayos bactericidas realizados en 2006 con *S. aureus* y *E. coli*, utilizando una sal de calcio (Ca), quitosano y V₁₀, (CTS-Ca₃V₁₀O₂₈) obtienen resultados satisfactorios³². Posteriormente en 2015, otro grupo de investigadores realizan estudios bactericidas con ácido 4-mercaptobenzoico ([4-(CH₃O)C₆H₄CH₂NH₃]₆(V₁₀O₂₈)·2H₂O) utilizando a *Enterococcus faecium* y comprueban el efecto microbicida³³.

Tras estos ensayos nuestro grupo de trabajo busca evidenciar si los compuestos que incluyen al V₁₀ con metformina o citosina, poseen actividad antimicrobiana en bacterias aisladas de pacientes con bacteriuria, esto como una fuente alternativa al tratamiento.

2.3. Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Determinar la CMI del decavanadato de metforminio, $[(C_4H_{12}N_5O)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 6H_2O]$ y decavanadato de citosinio $[(C_4H_6N_3O)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 4H_2O]$ en cepas aisladas de CIB's provenientes de pacientes con bacteriuria y en cepas de referencia ATCC: *E. coli* 25922 y *S. aureus* 29213.

2.3.2 Objetivos particulares

- Sintetizar y caracterizar por espectroscopía infrarroja (IR) a los decavanadatos de metformino y citosinio.
- Aislar e identificar bacterias provenientes de CIB's de pacientes con bacteriuria.
- Determinar la CMI de ampicilina (AMP), ceftriaxona (CRO) y amikacina (AMK) en cepas de referencia *E.coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de CIB's provenientes de pacientes con bacteriuria.
- Establecer el pH óptimo de la actividad antimicrobiana del decavanadato de amonio $[(NH_4)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 6H_2O]$ en *E. coli* ATCC 25922.
- Determinar la CMI de los decavanadatos de metformino y citosinio en cepas de referencia *E.coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de CIB's provenientes de pacientes con bacteriuria.

2.4. Hipótesis

2.4.1 Hipótesis alternativa

Los decavanadatos de metformino y citosinio tienen actividad antimicrobiana en cepas aisladas de CIB's provenientes de pacientes con bacteriuria y en cepas de referencia *E.coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213.

2.4.2 Hipótesis nula

Los decavanadatos de metformino y citosinio no tienen actividad antimicrobiana en cepas aisladas de CIB's provenientes de pacientes con bacteriuria y en cepas de referencia *E.coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213.

CAPÍTULO 3

3.1. Diseño de la investigación

3.1.1 Tipo de estudio

Analítico y experimental.

3.1.2 Definición del universo de trabajo

Cepas bacterianas aisladas de orinas que cumplan con los criterios de inclusión del Laboratorio *Laborat-2* de Nativitas, Tlaxcala, México.

3.1.3 Tamaño de la muestra

34 cepas bacterianas provenientes de orinas de pacientes con CIB's.

3.1.4 Tipo de muestreo

Intencional.

3.1.5 Criterios de selección

3.1.5.1 Criterios de inclusión

Orinas turbias con presencia de CIB's.

3.1.5.2 Criterios de exclusión

Orinas traslucidas, que presenten piuria o esterasa leucocitaria mayor a 125 leu/ μ L y con ausencia de CIB's.

3.1.6 Definición grupo de estudio

Cepas provenientes de CIB's aisladas de orinas de pacientes con bacteriuria y cepas de referencia *E.coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213.

3.1.7 Variables del estudio

Variables independientes	Variables dependientes
Compuestos de vanadio Concentración de compuestos pH del medio de cultivo a emplear Cepas control Cepas de trabajo	Concentración Inhibitoria

3.1.8 Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas

Estadística descriptiva de Excel.

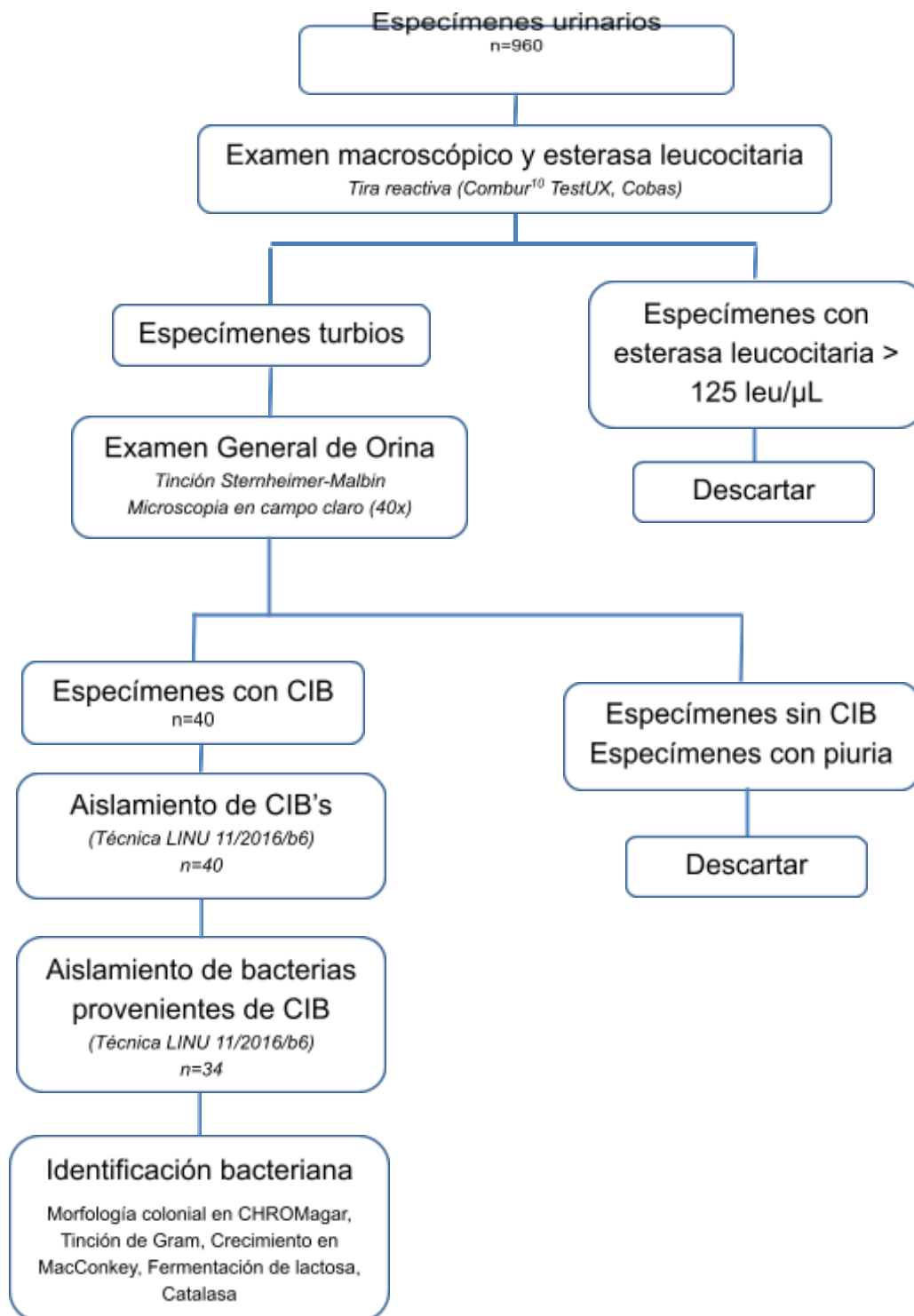
3.1.9 Aspectos bioéticos

3.1.9.1 Riesgo de la investigación

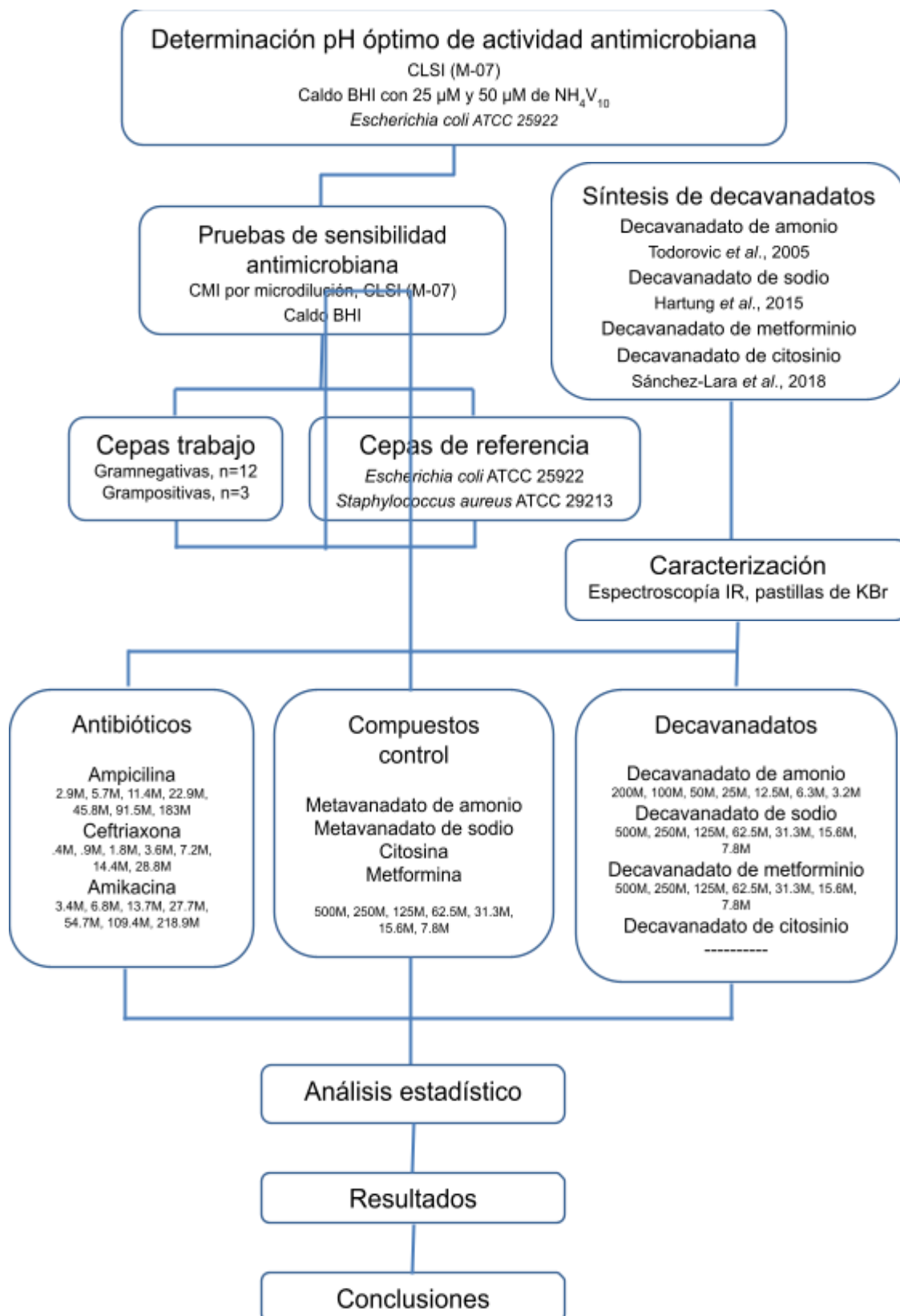
Los residuos peligrosos biológico-infecciosos serán tratados y desechados conforme a las especificaciones establecidos por la NOM 087.

3.2. Diagrama de trabajo

Fase 1



Fase 2



CAPÍTULO 4

4. Materiales y métodos

4.1 Metodología para la síntesis de decavanadatos

Todos los reactivos mencionados fueron obtenidos Aldrich y usados como se recibieron. Metavanadato de amonio (NH_4VO_3), ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-OH}$), NaVO_3 , ácido clorhídrico (HCl), bromuro de potasio (KBr) y citosina. El hidrocloreuro de metformina fue aislado de tabletas comerciales de 850 mg.

4.1.1 Síntesis de $(\text{NH}_4)_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28})\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Disolver 3.0 g (25 mmol) de NH_4VO_3 en 200 mL de agua en agitación constante a 60°C . Una vez obtenida la solución de NH_4VO_3 dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar 3.0 mL de $\text{CH}_3\text{-COOH}$ y mantener en agitación por 15 minutos, posteriormente añadir 50 mL de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-OH}$. Filtrar la solución final manteniéndola 48 horas a temperatura de $4.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ ⁶⁸.

Después de este tiempo se observan cristales anaranjados y brillosos. Los cristales se recolectan por filtración y se mantienen a temperatura ambiente $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ para su posterior uso.

4.1.2 Síntesis de $(\text{Na})_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28})\cdot 18\text{H}_2\text{O}$

Disolver 0.99 g (10 mmol) de NaVO_3 en 40 mL de agua en agitación constante a 40°C . Una vez obtenida la solución de NaVO_3 dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar 100 μL de HCl al 35% y mantener en agitación por 15 minutos. Filtrar la solución final manteniéndola a temperatura de $4.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ hasta la observación de cristales⁶⁹.

Después de 5 días se observan cristales anaranjados y brillosos, estos cristales son recolectados por filtración y mantenidos a temperatura ambiente.

4.1.3 Síntesis de $(C_4H_6N_3O)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 6H_2O$

Disolver 0.99 g de $NaVO_3$ en 50 mL de agua destilada en agitación a 40 °C. Una vez obtenida la solución dejar enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente añadir a la solución 100 μ L de HCl al 35% manteniendo la agitación. Agregar directamente 1.12 g (6 mmol) de clorhidrato de metformina por 20 minutos en agitación a 40 °C. Una vez pasado el tiempo de reacción filtrar la solución y esperar la cristalización del compuesto (entre 3 y 6 días aproximadamente)⁷⁰.

Los cristales obtenidos se recolectan por filtración y son mantenidos a temperatura ambiente.

4.1.4 Síntesis de $(C_4H_6N_3O)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 4H_2O$

Añadir 0.5 g (4.3 mmol) de NH_4VO_3 en 30 ml de agua destilada en agitación a 75°C hasta su disolución, la cual posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y después agregar 100 μ L de HCl al 35% con agitación constante. Una vez pasados 15 minutos, verter por goteo 20 ml de una solución con 0.111 g (1 mmol) de citosina manteniendo la reacción por 15 minutos⁷⁰. Finalmente se observa un precipitado de color anaranjado el cual es recolectado por filtración y mantenido a temperatura ambiente.

4.2 Caracterización de decavanadatos

La caracterización de los compuestos se realizó por espectroscopía infrarroja (IR). Los espectros IR fueron colectados en pastillas comprimidas de KBr en la región de 4000-400 cm^{-1} en un espectrofotómetro IR Digilab Scimitar FT-IR.

4.3 Metodología para el aislamiento de bacterias provenientes de CIB's

El método utilizado para realizar el aislamiento y recuperación de bacterias provenientes de una sola CIB, fue el protocolo "LINU 11/2016/b6", desarrollado por el Laboratorio de Investigaciones Nefrourológicas (LINU) en 2016 [anexo 9.1]. En la figura 5 se observa el resumen del protocolo.

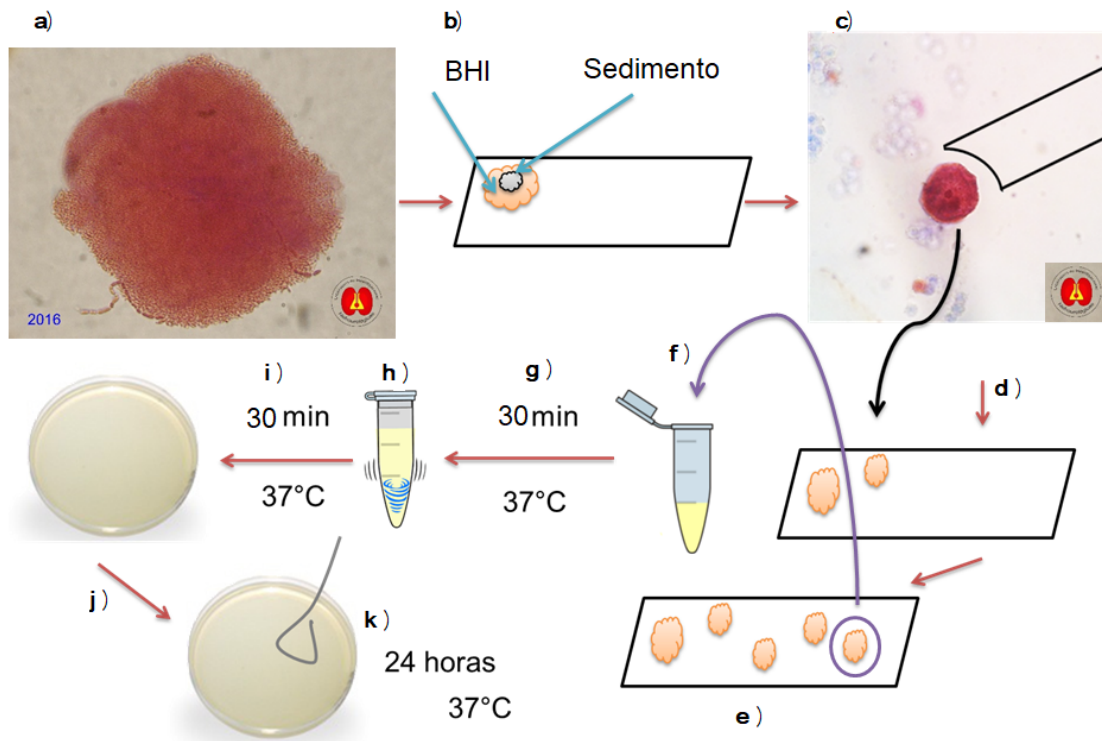


Figura 5. Aislamiento de CIB's. a) Identificación de sedimento urinario positivo a CIB's con Sternheimer-Malbin a 40X. b) Mezclar 5 µL de sedimento urinario sin colorante con 10 µL de caldo BHI en un portaobjetos estéril. c) Identificación de CIB's y su acercamiento a la micropipeta a 10X. d) Lavado con caldo BHI de la CIB aislada. e) Serie de lavados con caldo BHI hasta un aislamiento total. f) CIB aislada en un tubo eppendorf con 200 µL de caldo BHI. g) Incubación para evitar estrés bacteriano. h) Liberación de bacterias intracelulares, sometiendo a la célula a agitación mecánica con ayuda de un vortex. i) Incubación bacteriana después de la agitación. j) Sembrado de bacterias por extendido en placa en CHROMagar orientación para urocultivo. k) Incubación final para el desarrollo de crecimiento bacteriano.

4.4 Metodología para la identificación de bacterias provenientes de CIB's

1. Sembrar las muestras obtenidas en CHROMagar para urocultivo marca Becton, Dickinson and Company (BD). La identificación bacteriana se lleva a cabo en base a la morfología colonial después de 24 horas de incubación de acuerdo con las especificaciones del fabricante [anexo 9.2]. Siguiendo las especificaciones del fabricante se realizaron pruebas adicionales para la identificación bacteriana, como pruebas bioquímicas para enterobacterias [anexo 9.3].
2. Diferenciación de bacterias mediante Tinción de Gram [anexo 9.4].
3. Identificación bacteriana adicional mediante la observación de características morfológicas en medio de cultivo MacConkey (Tamaño, forma y textura de las colonias, fermentación de lactosa positiva o negativa y presencia o ausencia de precipitación de sales biliares) [anexo 9.5].
4. Identificación de bacterias productoras de catalasa, mediante su exposición a peróxido de hidrógeno [anexo 9.6].

4.5 Nomenclatura cepario

Para mejorar el control de las 24 cepas, se desarrolló una nomenclatura que permite identificar el tipo de aislamiento del que proviene la cepa, esto es para determinar si existe influencia en el microorganismo aislado cuando se encontraba interactuando con otro microorganismo o no. La nomenclatura consta de una combinación de números y letras, el número inicial indica el número de cepa. Las dos primeras letras (la primera con mayúscula y la segunda con minúscula) identifican el género bacteriano, la tercera letra (en mayúscula) indica si la cepa proviene de un aislamiento con uno, dos o tres microorganismos. Para las cepas provenientes de aislamientos polimicrobianos se añaden las letras 4 y 5 (la primera mayúscula y la segunda minúscula) referentes al género bacteriano con que la cepa se encontró (Figura 6).

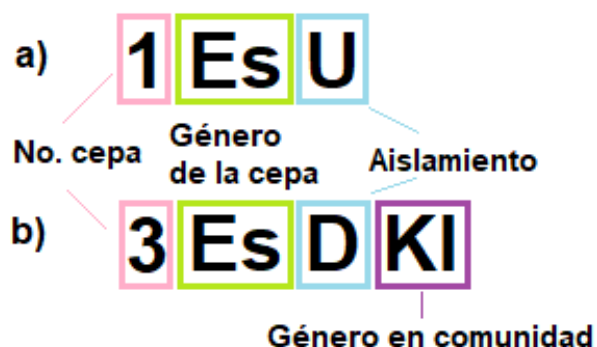


Figura 6. Nomenclatura desarrollada para cepas aisladas de CIB's. El número en rosa sirve para diferenciar cepas del mismo género. Las dos primeras letras en verde, indican el género de la cepa, la tercera letra en azul indica el tipo de cultivo del que proviene, la cuarta y quinta letra en morado indican el género bacteriano con quien estuvo en comunidad. **a)** Cepa uno de *E. coli* proveniente de un aislamiento único. **b)** Cepa 3 de *E. coli* proveniente de un aislamiento doble en comunidad con *Klebsiella sp.*

Las abreviaturas utilizadas para la nomenclatura, se encuentran en la tabla 1.

Indicación	Abreviatura	Significado
Género bacteriano	Es	<i>Escherichia</i>
	En	<i>Enterobacter</i>
	KI	<i>Klebsiella</i>
	Ec	<i>Enterococcus</i>
	Pr	<i>Providencia</i>
	St	<i>Stenotrophomonas</i>
	Sc	<i>Staphylococcus</i>
Tipo de aislamiento	U	Con un microorganismo
	D	Con dos microorganismos
	T	Con tres microorganismos

Tabla 1. Nomenclatura de cepas por abreviaturas.

4.6 Metodología para establecer el pH óptimo de actividad antimicrobiana de decavanadatos

1. Preparar caldo infusión cerebro corazón (BHI) disolviendo 0.37 g de medio de cultivo BHI en 12 ml siguiendo las especificaciones del fabricante (DIBICO).
2. Tomar 4 vasos de precipitados de 50 ml marcándolos con las letras A, B, C y D. A cada vaso de precipitado dispensar 2.5 ml de caldo BHI, posteriormente acondicionar como se describe a continuación:
 - a. Agregar 50 μL de HCl al 10% ajustando el pH a 5.0 al vaso marcado con la letra A.
 - b. Agregar 25 μL de HCl 10% ajustando el pH a 6.0 al vaso B.
 - c. No agregar nada y verificar que el pH es el indicado por el fabricante (6.8 ± 0.2) para el vaso marcado C.
 - d. Añadir 75 μL de hidróxido de sodio (NaOH) 10 % para ajustar el pH a 8.0 en el vaso D.
3. Esterilizar el medio de cultivo preparado a 15 libras por 15 minutos.
4. En una placa estéril de 96 micropocillos con fondo en U preparar 4 filas con nueve micropocillos, como se describe a continuación:
 - a. La primera fila (letra A), las columnas (pocillos) se numeran del 1 al 9.
 - I. [A,1] Control negativo de crecimiento 25 μM a pH 5.0.
40 μL de caldo BHI pH 5.0, 10 μL de NH_4V_{10} 250 μM y 50 μL de solución salina isotónica (SSI).
 - II. [A, 2, 3, 4] Evaluación actividad antimicrobiana 25 μM a pH de 5.0.
40 μL de caldo BHI pH 5.0, 10 μL de NH_4V_{10} 250 μM y 50 μL de inóculo 0.5 McFarland de *E. coli* ATCC 25922.
 - III. [A,5] Control negativo de crecimiento 50 μM .
40 μL de caldo BHI 5.0, 10 μL de NH_4V_{10} 500 μM y 50 μL de SSI.
 - IV. [A,6, 7, 8] Evaluación actividad antimicrobiana 50 μM a pH de 5.0.

40 µL de caldo BHI pH 5.0, 10 µL de compuesto 500 µM y 50 µL de inóculo 0.5 McFarland (*E.coli* ATCC 25922).

- V. [A,9] Control positivo de crecimiento bacteriano a pH de 5.0.
40 µL de caldo BHI pH 5.0, 10 µL de agua inyectable y 50 µL de inóculo 0.5 McFarland (*E.coli* ATCC 25922).
- b. La segunda fila (letra B), identificar las columnas del 1 al 9, y repetir los incisos del 4.a.I al 4.a.V, cambiando el pH del caldo BHI a 6.0.
- c. La tercera fila (letra C), identificar las columnas del 1 al 9, y se repiten los incisos del 4.a.I al 4.a.V cambiando el pH del caldo BHI a 7.0.
- d. La cuarta fila (letra D), identificar las columnas del 1 al 9, y se repiten los incisos del 4.a.I al 4.a.V cambiando el pH del caldo BHI a 8.0.
- e. Incubar la placa a 37° por 24 horas.
- f. El observar la presencia de turbidez en los pocillos inoculados evidencia el crecimiento bacteriano.
- g. Tomar 10 µL de cada pocillo en donde no se observe turbidez y depositarlos en la superficie de una placa de Agar Mueller-Hinton (MHA).
 - I. Dejar secar 2 minutos y posteriormente invertir la placa.
 - II. Incubar la placa por 24 horas a 37°C.
 - III. Observar si hay presencia de crecimiento bacteriano en la zona de inoculación, el cual se verá reflejado con la presencia de una colonia bacteriana.
- IV. Identificar el pH del medio en que ocurre la actividad antimicrobiana de los compuestos.

En la figura 7 se representa el esquema de una placa de micropocillos, con las indicaciones del contenido de cada pocillo así como su función en el protocolo, es decir los controles positivos y negativos de crecimiento bacteriano y los pocillos de prueba a diferentes concentraciones y pH.

		Concentración μM								
		25				50				-
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	5.0	A								
	6.0	B								
	7.0	C								
	8.0	D								
		50 μL SSI	50 μL Inóculo 0.5 McFarland			50 μL SSI	50 μL Inóculo 0.5 McFarland			
		10 μL Decavanadato de Amonio 250 μM			10 μL Decavanadato de Amonio 500 μM			10 μL agua inyectable		
		40 μL caldo BHI a su respectivo pH								
		Control negativo				Control negativo				Control Positivo

Figura 7. Placa de micropocillos para la determinación de pH óptimo de actividad antimicrobiana de decavanadatos. Las filas A, B, C y D indican los pH de prueba 5, 6, 7 y 8 respectivamente. Las columnas 1 y 5, **rojo**: controles negativos de crecimiento a concentración de 25 μM y 50 μM de NH_4V_{10} . La columna 9, **amarillo**: controles positivos de crecimiento de *E.coli* ATCC 25922. Las filas 2-4 y 6-8, **morado**: representan los pocillos de prueba con concentraciones de 25 μM y 50 μM respectivamente. Los círculos blancos representan los pocillos de trabajo.

4.7 Metodología para determinar la CMI por microdilución

La determinación de CMI por microdilución se llevará a cabo siguiendo la metodología descrita en la guía M-07 del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés)⁴², cambiando el medio indicado (CAMHA) por BHI, por adaptación del laboratorio.

Para citosina, metformina (Metf), NH_4VO_3 , NaVO_3 , AMP, CRO y AMK se trabajará con pH neutro. Para los compuestos NH_4V_{10} , decavanadato de sodio (NaV_{10}), decavanadato de metforminio MetfV_{10} y decavanadato de citosinio

(CitV₁₀) se trabajará con pH elegido según los resultados obtenidos en la metodología 4.6.

1. En una placa estéril de 96 micropocillos con fondo en U se prepara la fila A, y las columnas del 1-10 de la siguiente manera (Figura 7).
 - a. [A,1] Pocillo de prueba a 500 µM.
90 µL de caldo BHI y 10 µL de compuesto de trabajo (5.0 mM).
 - b. [A,2-8] Pocillos de prueba a, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8 µM.
50 µL de caldo BHI.
 - c. [A,9] Control positivo de crecimiento.
40 µL de caldo BHI, 10 µL de agua inyectable y 50 µl de inóculo 0.5 McFarland de la cepa en estudio.
 - d. [A,10] Control negativo de crecimiento.
40 µL de caldo BHI, 10 µl de compuesto (5.0 mM) y 50 µl de SSI.
2. Realizar una serie de diluciones 1:2 de los pocillos **A1-A8**.
 - a. Tomar 50 µL del pocillo A1 y pasarlos al pocillo A2, homogeneizar con la misma pipeta succionando y expulsando tres veces la mezcla.
 - b. Tomar 50 µL del pocillo A2 y pasarlos al pocillo A3, homogeneizar con la misma pipeta succionando y expulsando tres veces la mezcla. Repetir este paso hasta llegar al pocillo A8.
 - c. Desechar 50 µL del pocillo A8.
 - d. Agregar 50 µL de inóculo (0.5 McFarland) de la cepa en estudio a los pocillos **A1-A8**, quedando un volumen final de 100 µL.
3. Repetir los pasos 1 y 2 en las filas B, C, D, E, etc., cambiando la cepa en estudio.
4. Incubar la placa de micropocillos a 37° C por 24 horas.
5. Posterior a la incubación observar a contraluz la turbidez en los pocillos, la presencia de turbidez indicará crecimiento bacteriano, y por lo tanto resistencia al fármaco probado a esa concentración.

6. Para asegurar la inhibición de crecimiento bacteriano (Figura 8), en cada una de las filas (A-G) identificar el pocillo de la columna 8 (el de menor concentración, 7.8 μM), al pocillo de la columna 1 (el de mayor concentración, 500 μM) y realizar el siguiente proceso.
 - a. De cada fila, identificar los pocillos en los que no se observe turbidez.
 - I. Tomar 10 μL del primer pocillo en el que ya no se observe turbidez y sembrarlo por goteo en MHA.
 - II. Tomar 10 μL del pocillo inmediato anterior donde tampoco se observe turbidez y sembrarlo por goteo en MHA.
 - b. Incubar las placas inoculadas a 37°C por 24 horas.
 - c. Observar si la presencia de crecimiento bacteriano en las placas inoculadas.
 - d. La CMI será la concentración del pocillo en la cual la placa de MHA no presente crecimiento.
7. Repetir el paso 6 para cada una de las filas (cepas en estudio).
8. Repetir los pasos 1-7 para AMP, manteniendo la concentración máxima de 183.0 μM y mínima de 2.9 μM .
9. Repetir los pasos 1-7 para CRO, manteniendo la concentración máxima de 28.8 μM y mínima de 0.4 μM .
10. Repetir los pasos 1-7 para AMK, manteniendo la concentración máxima de 218.9 μM y mínima de 3.4 μM .

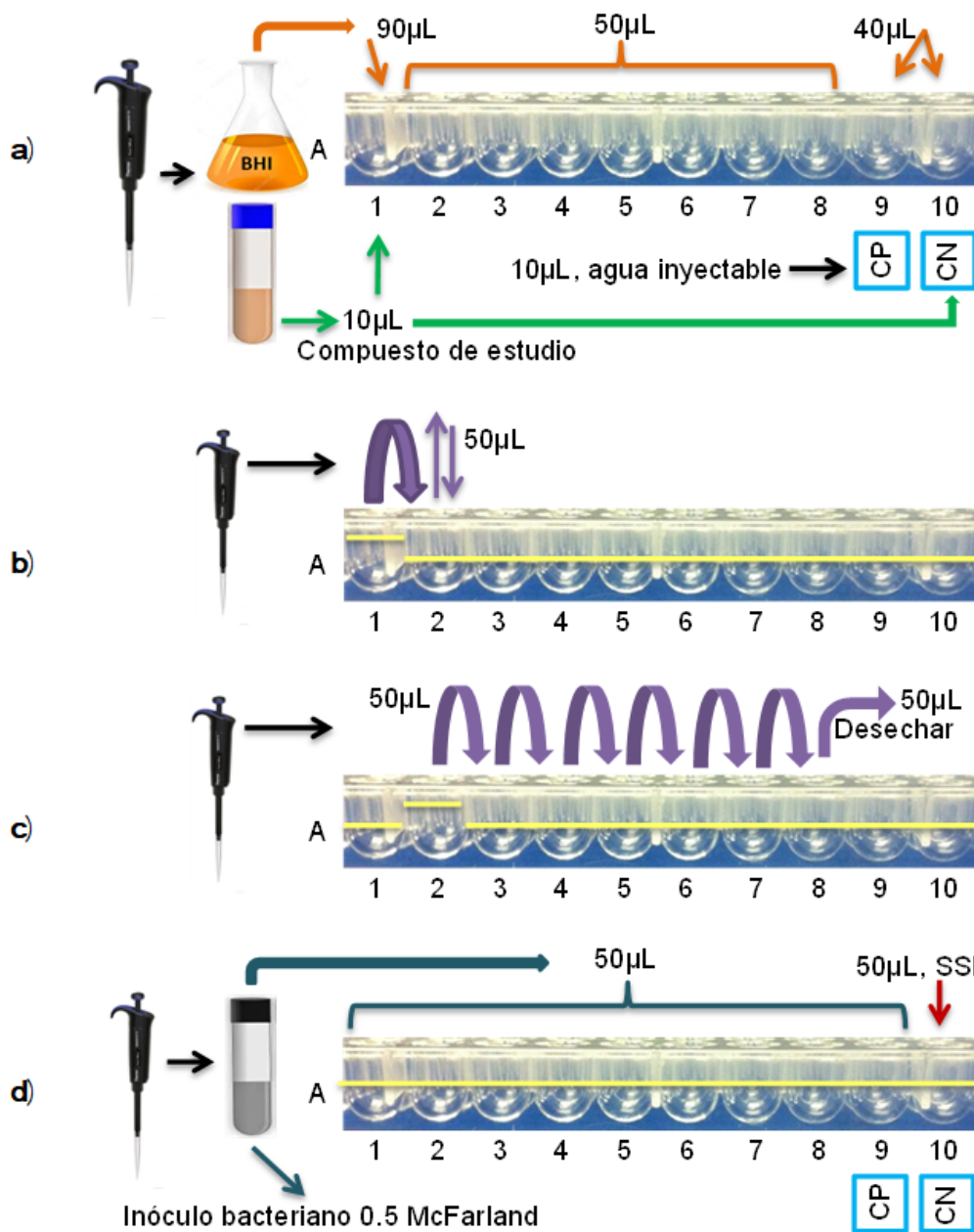


Figura 8. Preparación de pocillos para la determinación de CMI. Preparación de los de la fila A para determinar la CMI de los compuestos de estudio con las diferentes cepas. Las columnas 1-8 representan los pocillos de prueba, los pocillos 9 y 10 representan los controles positivos y negativos respectivamente. **a)** Llenado de pocillos con caldo BHI, compuesto de estudio y agua inyectable. **b)** Dilución 1:2 del pocillo 1 al pocillo 2 mediante la homogenización del pocillo 1 con la micropipeta, tomar 50 μL del contenido del pocillo 1 y transferirlos al pocillo 2. **c)** Serie de diluciones 1:2 de los pocillos 2 a 8, desechar 50 μL del pocillo 8. **d)** Llenado de pocillos 1-9 con 50 μL de

inóculo bacteriano 0.5 McFarland y al pocillo 10 con 50 μL de SSI. CP (control positivo), CN (control negativo), SSI (solución salina isotónica).

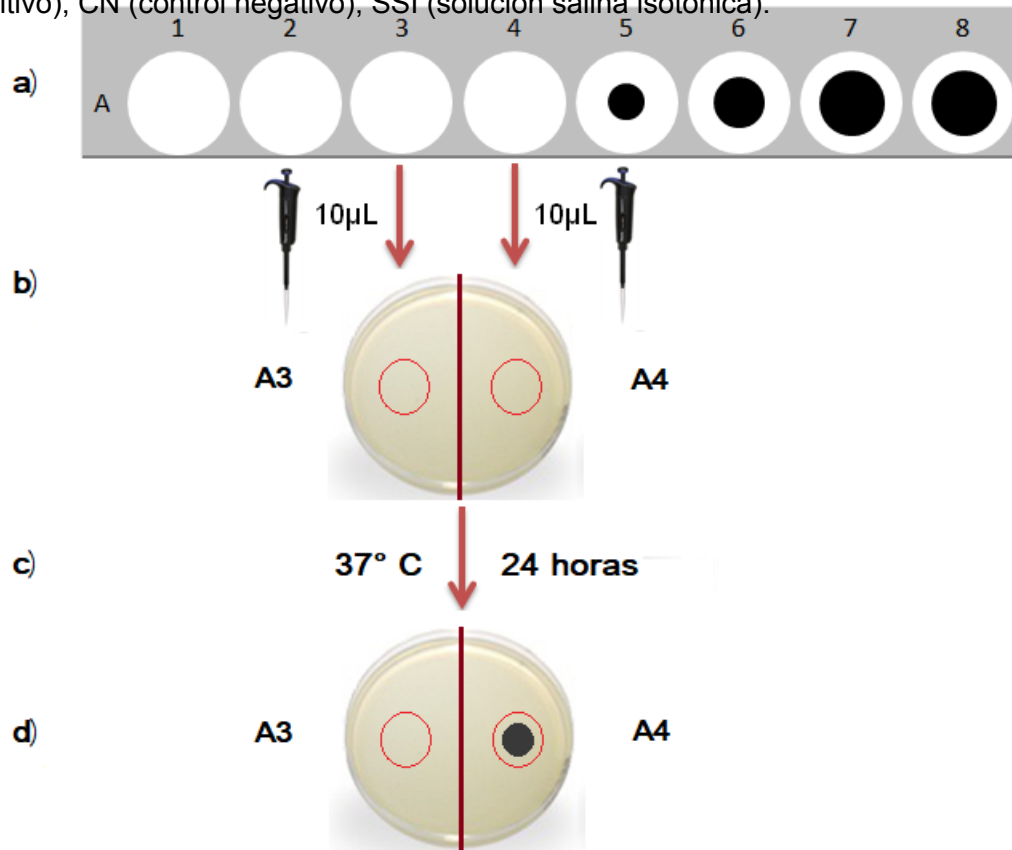


Figura 9. Confirmación de CMI. Para asegurar que no exista la presencia de crecimiento bacteriano en el pocillo de prueba donde no se observa turbidez, es necesario sembrar su contenido en MHA. **a)** Identificación de los pocillos de menor concentración en donde no se observe turbidez. **b)** Sembrado por goteo de 10 μL del contenido de los pocillos seleccionados en una placa de MHA. **c)** Incubación de la placa sembrada a 37°C por 24 horas. **d)** Lectura de la placa sembrada, en la sección del pocillo A4 se observa un círculo se color negro, el cual representa crecimiento bacteriano. En la sección del pocillo A3 no se observa la presencia de crecimiento bacteriano, por lo tanto la CMI es la correspondiente al del pocillo A3.

CAPÍTULO 5

5. Resultados

5.1 Síntesis de decavanadatos

Compuesto	pH de síntesis	Temperatura de cristalización	Tiempo de recolección	Hábito cristalino
NH_4V_{10}	5.6	$5 \pm 2^\circ\text{C}$	16 días	Laminar
NaV_{10}	5.2	$5 \pm 2^\circ\text{C}$	8 días	Laminar
MetfV_{10}	6.4	$23 \pm 2^\circ\text{C}$	5 días	Acicular
CitV_{10}	5.4	$23 \pm 2^\circ\text{C}$	10 minutos	Microgranular

Inicialmente se trabajó con 4 decavanadatos, dos de ellos (NH_4V_{10} y NaV_{10}) sintetizados y caracterizados por otros investigadores^{72,73}, y dos compuestos nuevos (MetfV_{10} y CitV_{10}) sintetizados y caracterizados por el Laboratorio de Bioinorgánica Aplicada del Instituto de Ciencias BUAP (ICUAP)⁷⁴; la metodología realizada para la síntesis de los decavanadatos se describe en la sección 9.1. Las características de los cristales obtenidos: pH de síntesis, temperatura de cristalización, tiempo de recolección y hábito cristalino se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Características de cristales de decavanadatos. NH_4V_{10} (Decavanadato de amonio), NaV_{10} (Decavanadato de sodio), MetfV_{10} (Decavanadato de metforminio), CitV_{10} (Decavanadato de citosinio).

5.2 Caracterización de decavanadatos

Debido a que los decavanadatos asociados a amonio ($[\text{NH}_4]^+$) y sodio (Na^+), fueron sintetizados y caracterizados por Todorovick *et al.*, y Hartung *et al.*, respectivamente; y los asociados a citosina y metf por Sánchez-Lara *et al.*, la composición de los compuestos fue comprobada por espectroscopía IR (Figura 10).

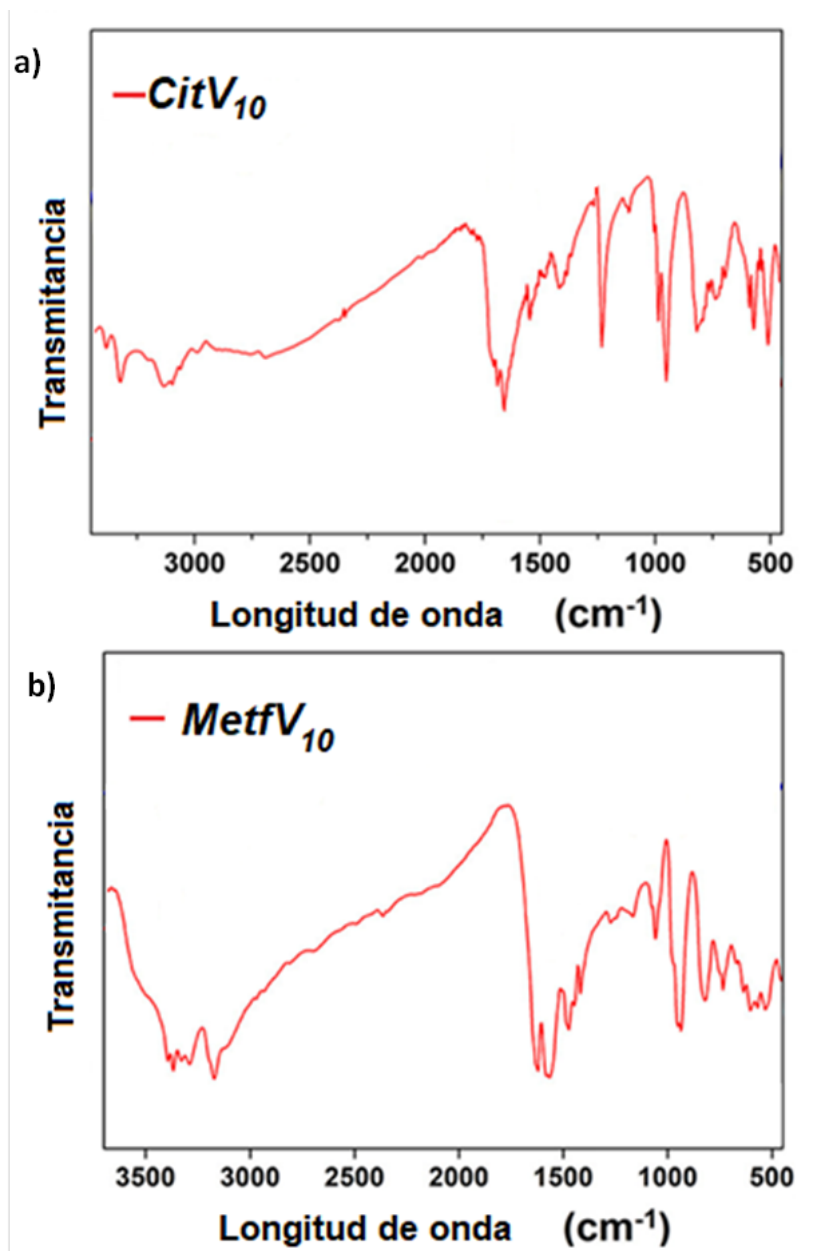


Figura 10. Espectros IR de los compuestos $(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_3\text{O})_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28})\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_3\text{O})_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28})\cdot 4\text{H}_2\text{O}$. a) espectro IR de CitV₁₀ b) espectro IR de MetfV₁₀

En el espectro medio (4000–400 cm⁻¹) del compuesto CitV₁₀, se muestra un conjunto de picos en la región de alta frecuencia en 3,486-2,684 cm⁻¹, correspondientes a enlaces (N-H) y (C-H). Las fuertes vibraciones observadas

en 1,718-1,656 cm^{-1} se asignaron a enlaces (C=O), (C=C) y (C=N). Estas bandas corresponden a los enlaces de la molécula de citosina.

Para el compuesto MetfV₁₀, las bandas en 3,395–3,170 cm^{-1} se atribuyen a enlaces (N–H). Por otro lado, las bandas débiles en 2,972 y 2,936 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de los grupos metilo de HMetf. Las bandas de intensidad fuerte en 1,624 y 1,569 cm^{-1} podrían originarse por (C=N). Las bandas corresponden a los enlaces presentes en la molécula HMetf.

Para ambos ocmpuestos, las bandas observadas a 987 y 952 cm^{-1} se asignan a los enlaces V=O terminales del anión decavanadato. Las bandas en la región de 833–513 cm^{-1} se atribuyen a los enlaces (V–O–V). Bandas correspondientes a V₁₀.

La caracterización detallada de ambos compuestos (espectros IR y Raman, RMN-V⁵¹, así como el análisis cristalográfico y termogravimétrico). Se encuentran disponibles en el artículo publicado por Sánchez-Lara *et al.*, en 2018 (anexo 9.7)

5.3 Aislamiento e identificación de bacterias provenientes de CIB's

Para esta investigación, se recolectaron 960 especímenes urinarios que cumplieron con los criterios de inclusión-exclusión para la realización del examen general de orina (EGO) del Laboratorio de análisis clínicos “Laborat-2” en Nativitas, Tlaxcala. De este universo de trabajo se seleccionaron 40 especímenes (4.2%), que presentaban uroepitelio con CIB's, a las que se les realizó el aislamiento, cultivo e identificación de las bacterias contenidas en las CIB's mediante la técnica desarrollada en el LINU (LINU 11/2016/b6).

De las 40 CIB's asiladas en CHROMagar orientación para urocultivo: en 24 (60%) se observó desarrollo bacteriano; de los cultivos positivos, en 15 (35%) se aisló un solo microorganismo; en 8 (20%) se observó el desarrollo dos y en 1 (2.5%) el cultivo presentó tres.

De estos 24 cultivos positivos, se recuperaron e identificaron 34 cepas mediante su aislamiento en CHROMagar orientación para urocultivo (Figura 11), posteriormente se complementó la identificación de género y especie mediante las pruebas complementarias de tinción de Gram, producción de catalasa y sus características en medio MacConkey (fermentación de lactosa, precipitación de sales biliares, color del medio, forma y textura de la colonia). Por otra parte y siguiendo las especificaciones del fabricante de CHROMagar orientación (BD), la diferenciación de *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* caracterizadas por colonias mucóides con coloración azul metálico (Figura 11b y 11ci), se confirmó con pruebas bioquímicas.

De igual forma, se realizó identificación bacteriana por pruebas bioquímicas para las colonias con coloración beige para la diferenciación de los géneros *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Salmonella*.

De las 34 cepas obtenidas: 16 cepas (47.1%) fueron identificadas como *E. coli*, 10 cepas (29.4%) como *K. pneumoniae*, 2 cepas (5.9%) como *Enterococcus* sp., 2 cepas (5.9%) como *Enterobacter* sp., 2 cepas (5.9%) como *Stenotrophomonas maltophilia*, 1 cepa (2.9%) como *S. aureus* y 1 cepa (2.9%) como *Providencia. rettgeri* (2.9%). Estos resultados se resumen en la figura 12.

En el primo-aislamiento de CIB's, se encontraron 15 cepas provenientes de cultivos con un solo microorganismo: 9 (60.0%) correspondientes a *E. coli*, 4 (26.6%) a *Klebsiella* sp., 1 (6.7%) a *Enterococcus* sp. y 1 (6.7%) a *P. rettgeri*. 16 cepas fueron recuperadas de cultivos de aislamientos con crecimiento de dos bacterias: 6 (37.5%) de *E. coli*, 6 (37.5%) de *Klebsiella* sp., 2 (12.5%) de *Enterobacter* sp. y 2 (12.5%) de *S. maltophilia*. 3 cepas se recuperaron en el cultivo con aislamiento de tres bacterias: 1 (33.3%) de *E. coli*, 1 de *Enterococcus* sp. (33.3%) y 1 de *S. aureus* (33.3%) (anexo 9.8).

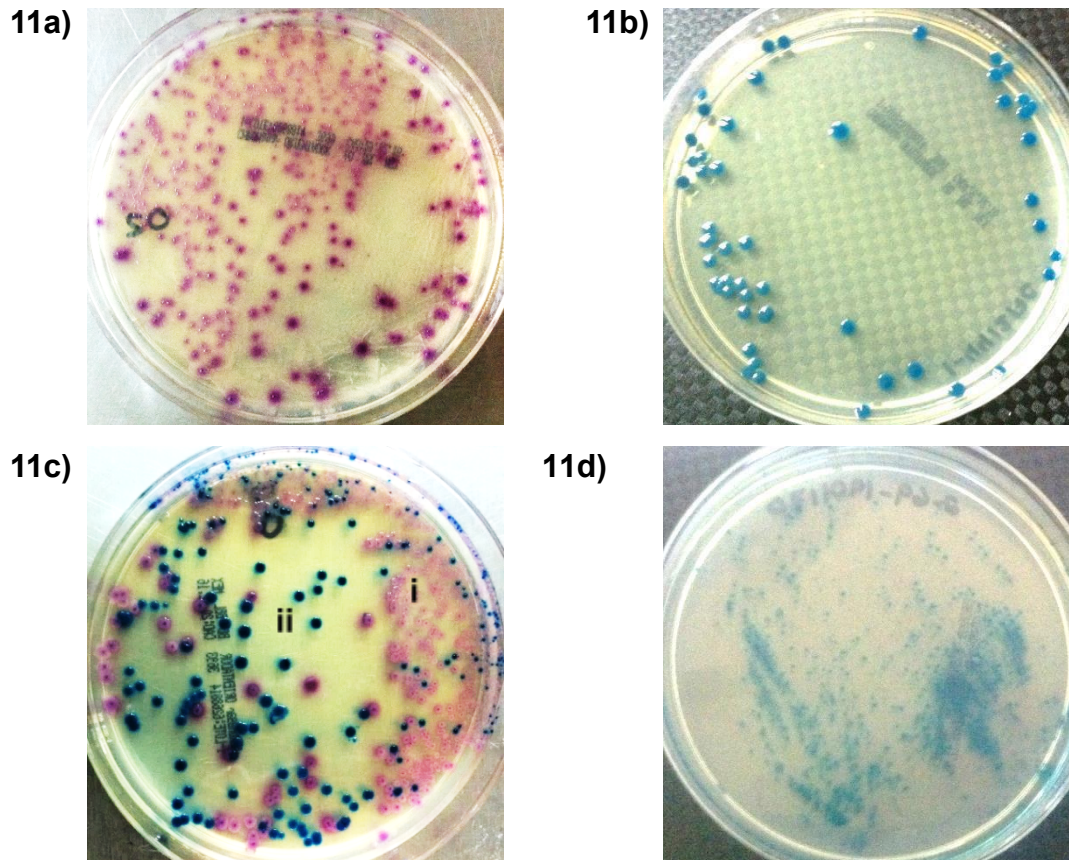


Figura 11. Identificación bacteriana en CHROMagar orientación para urocultivo. Cultivos bacterianos después de 24 horas de incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, en CHROMagar orientación para urocultivo, sembrados por extendido en placa. **11a)** Cultivo de *E. coli* en el que se observan las colonias típicas de color rosa. **11b)** Cultivo de *Klebsiella* sp. con colonias azul metálico de consistencia mucóide. **11c)** Cultivo con crecimiento de dos colonias diferentes. **i)** Se observan colonias rosa correspondientes a *E. coli*. **ii)** Se observan colonias azul metálico correspondientes a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. **11d)** Cultivo de *Enterococcus* sp., colonias puntiformes azul-turquesa.

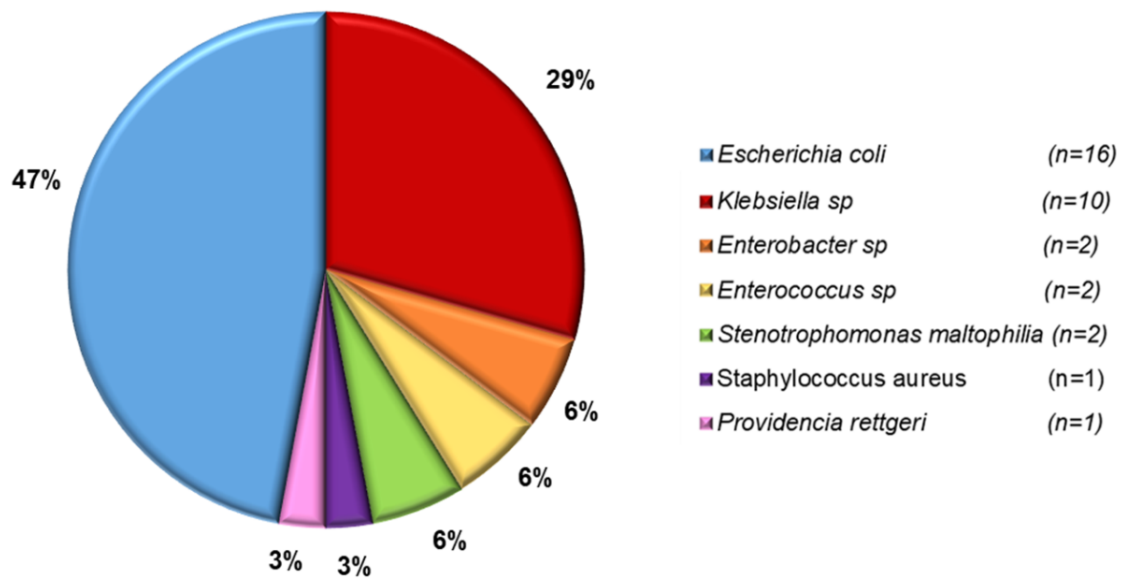


Figura 12. Etiología de cepas provenientes de CIB's. *E. coli* es el microorganismo que se aisló con mayor frecuencia (47%), seguido de *Klebsiella sp.* (29%). Enseguida se identificaron cepas de bacterias no fermentadoras (9%), (*Stenotrophomonas maltophilia* y *Providencia rettgeri*). En cuarta posición se identificaron a *Enterobacter sp.* (6%) y *Enterococcus sp.* (6%) y en quinta posición se identificó a *S. aureus.*(3%).

5.4 Determinación del pH óptimo de actividad antimicrobiana de decavanadatos

La cepa de trabajo *E. coli* ATCC 25922 se mantuvo a -60°C en caldo soya tripticaseína (TSB por sus siglas en inglés) con 20% de glicerol. Posteriormente se descongeló en caldo TSB y mantenida en refrigeración a 5°C . Para su utilización, fue resembrada por estría cruzada en medio nutritivo 24 horas antes de realizar el protocolo. La placa de micropocillos fue esterilizada por UV, y la solución del compuesto de estudio, por microfiltración (Microfiltro Millex estéril, con membrana PVDF, Durapore, con un diámetro de poro de $0.22\ \mu\text{M}$) 15 minutos antes de realizar el protocolo. Para obtener el pH óptimo de la actividad antimicrobiana, se realizó una modificación de la metodología descrita en las guías del CLSI para la determinación de CMI por microdilución M-07, utilizando caldo BHI como medio de cultivo y las concentraciones fijas de $50\ \mu\text{M}$ y $25\ \mu\text{M}$ de NH_4V_{10} . Posterior a las 24 horas de incubación, se realizó la observación de micropocillos; en los pocillos de prueba a $25\ \mu\text{M}$ a pH de 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0, se observó turbidez, lo que indica que el compuesto no inhibe el crecimiento bacteriano. Sin embargo, para los pocillos con $50\ \mu\text{M}$ se observó inhibición del crecimiento bacteriano a pH de 5.0 y 6.0, y no presentó inhibición a pH de 7.0 y 8.0 (Figura 13).

Para confirmar la inhibición del crecimiento bacteriano, se tomaron $10\ \mu\text{L}$ del contenido previamente homogenizado por succión y eyección con la misma pipeta, y se sembraron por goteo en MHA; después de 24 horas de incubación a 37°C , se observó crecimiento bacteriano en todas las placas de MHA.

El que no se observe turbidez en los micropocillos; sugiere que el pH es un factor que influye en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana para decavanadatos, y que el pH de 5.0 y 6.0, es el idóneo para llevar a cabo las determinaciones de CMI.

		Concentración μM									
		25				50				-	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
pH	5.0	A									
	6.0	B									
	7.0	C									
	8.0	D									
			50 μL SSI	50 μL Inóculo 0.5 McFarland			50 μL SSI	50 μL Inóculo 0.5 McFarland			
			10 μL Decavanadato de Amonio 250 μM			10 μL Decavanadato de Amonio 500 μM			10 μL agua inyectable		
			40 μL caldo BHI a su respectivo pH								
			Control negativo				Control negativo				Control Positivo

Figura 13. pH óptimo de actividad antimicrobiana de decavanadatos. Todos los pocillos fueron preparados con 50 μL de caldo BHI como medio de cultivo. Las filas A, B, C y D indican los pH de prueba 5, 6, 7 y 8 respectivamente, las columnas 1 y 5 son los controles negativos de crecimiento con 50 μL de SSI, a concentración de 25 μM y 50 μM de NH_4V_{10} , , la fila 9 presentan los controles positivos de crecimiento de *E.coli* ATCC 25922, con agua inyectable en lugar de compuesto. Las columnas 2, 3 y 4 representan los pocillos de prueba, a estos se les agregó 50 μL de inóculo bacteriano (0.5 McFarland).

Los pocillos de prueba se representan en las filas 2, 3 y 4 con concentración de 25 μM , las filas 6, 7 y 8 con concentración de 50 μM . Los pocillos representados con círculos blancos representan la ausencia de crecimiento bacteriano. Los pocillos representados con círculos negros indican la presencia de crecimiento bacteriano. De acuerdo al esquema, no se observó turbidez en los pocillos de las filas A y B de las columnas 6, 7 y 8. Siendo los pH idóneos para trabajar 5.0 y 6.0 a partir de una concentración de 50 μM .

5.5 Determinación de CMI

Se trabajaron con cepas ATCC como control para la determinación de sensibilidad antimicrobiana: *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213.

Para la determinación de CMI en bacterias provenientes de CIB's, 15 cepas fueron elegidas según los agentes bacterianos más frecuentes en ITU's (*E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp. y *S. aureus*). Las cepas de trabajo pertenecen a diferentes tipos de aislamientos incluyendo con crecimiento de uno, dos y tres microorganismos. Las cepas seleccionadas se encuentran distribuidas en la tabla 3.

Aislamiento			
Un microorganismo	Dos microorganismos		Tres microorganismos
1 Es U	1 Es D KI	1 KI D Es	1 Es T
1 KI U	2 Es D KI	2 KI D Es	1 Ec T
2 KI U	1 Es D En	1 En D Es	1 Sc T
1 Ec U	2 Es D En	2 En D Es	

Tabla 3. Cepas seleccionadas para la determinación de CMI. 4 cepas provenían de cultivos con un solo microorganismo: 1 cepa de *E. coli*, 2 cepas de *Klebsiella* sp. y 1 de *Enterococcus* sp. 8 cepas provenían de cultivos con desarrollo de dos microorganismos: 4 cepas de *E. coli*, 2 cepas de *Klebsiella* sp. y 2 cepas de *Enterobacter* sp. Finalmente, 3 cepas provenían de cultivos con desarrollo de tres microorganismos: 1 cepa de *E. coli*, 1 de *Enterococcus* sp. y 1 de *Staphylococcus* sp. Es (*Escherichia*), KI (*Klebsiella*), Ec (*Enterococcus*), En (*Enterobacter*), Sc (*Staphylococcus*), U (un microorganismo), D (dos microorganismos), T (Tres microorganismos).

5.5.1 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

5.5.1.1 CMI de antibióticos

Para la interpretación de los resultados obtenidos, se aplicaron parámetros de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia; estos parámetros se

establecieron con base a las tablas 2A-1, 2C y 2D presentes en la guía M100 del CLSI, los valores descritos en µg/ml y sus equivalencias en µM se encuentran en los anexos 9.9 y 9.10.

Los resultados muestran que para *E. coli* con AMK; 2 cepas (33.3%) fueron sensibles, 1 (16.7%) con sensibilidad intermedia a CRO y 100.0%. Los resultados con CRO denotan que 3 cepas (50.0%) fueron sensibles y 3 cepas (50.0%) resistentes. En el caso de AMK las 6 cepas (100.0%) presentaron resistencia.

Los resultados con *Klebsiella sp.* reflejaron que las 4 cepas (100.0%) tuvieron resistencia a AMP, CRO y AMK.

Para *Enterobacter sp.* las 2 cepas (100.0%) presentaron resistencia a AMP, CRO y AMK.

Con la cepa de *S. aureus* (100%), CRO no está indicado para su análisis. En el trabajo con AMP y CRO la cepa presentó resistencia con ambos antibióticos.

En el caso *Enterococcus sp.*, CRO y AMK no están indicados para el análisis con este género bacteriano. En los resultados con AMP, las 2 cepas (100.0%) presentaron resistencia. Las concentraciones obtenidas se encuentran en la tabla 6.

15 cepas provenientes de CIB's fueron probadas para determinar la CMI de AMP, de las cuales, el 13.3% fueron sensibles, 6.7% con sensibilidad intermedia y 80.0% resistencia. A 12 cepas se les determinó la CMI de CRO, 50.0% presentaron sensibilidad, 25.0% sensibilidad intermedia y 25.0% resistencia. A 13 cepas se les determinó la CMI de AMK, de las cuales el 100.0% presentaron resistencia (Figura 14).

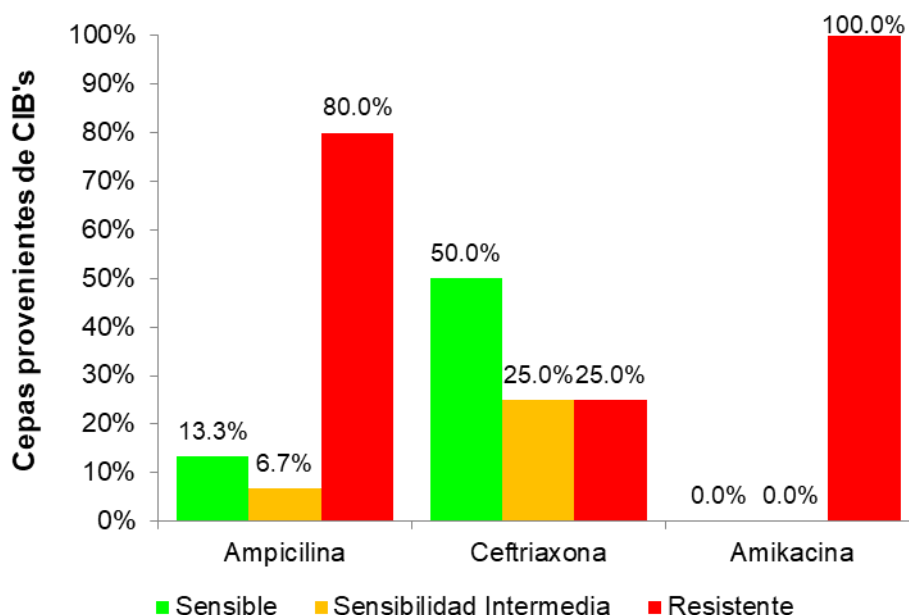


Figura 14. Sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia de cepas aisladas de CIB's a ampicilina, ceftriaxona y amikacina.

Para diferenciar mejor la resistencia a los antibióticos de las cepas provenientes de cultivos con aislamientos de uno, dos y tres microorganismos provenientes de la misma CIB; se calculó el porcentaje de resistencia a cada grupo y de este análisis se observó que las cepas provenientes de cultivos con un microorganismo, tuvieron 100.0% de resistencia a AMP, 66.7% a CRO. Las cepas provenientes de cultivos con dos bacterias tuvieron 62.5% de resistencia a AMP, 50.0% a CRO y 100.0% a AMK. Las cepas provenientes de cultivos con tres microorganismos diferentes presentaron 100.0% a AMP, 0.0% a CRO y 100.0% a AMK. Los porcentajes se encuentran en la tabla 4.

Tipo de cepa aislada	Porcentaje de resistencia		
	AMP	CRO	AMK
Única	100.0 % n= 4	66.7 % n= 3	100.0 % n= 3
Asociada a otra bacteria	62.5 % n= 8	50.0 % n= 8	100.0 % n= 8
Asociada a dos bacterias	100.0 % n= 3	0.0 % n= 1	100.0 % n= 2

Tabla 4. Porcentaje de resistencia a los antibióticos por tipo de cepa. AMP (Ampicilina), CRO (Ceftriaxona), AMK (Amikacina).

5.5.1.2 CMI de decavanadatos

Para las 13 cepas de enterobacterias analizadas (12 cepas provenientes de CIB's y una cepa ATCC), los compuestos Metf, NaVO_3 , NH_4VO_3 , MetfV_{10} , NaV_{10} no inhibieron su crecimiento a las concentraciones probadas por lo que su CMI se consideró mayor a 500 μM , y mayor a 200 μM para NH_4V_{10} .

Para las 4 cepas de cocos Grampositivos en estudio (3 cepas provenientes de CIB's y una cepa ATCC), los compuestos Metf, NaVO_3 y NH_4VO_3 no inhibieron su crecimiento a una concentración de 500 μM , por lo que también se consideró su CMI mayor a 500 μM .

Los compuestos MetfV_{10} , NaV_{10} y NH_4V_{10} no inhibieron el crecimiento de la cepa clínica de *S. aureus*, sin embargo, para la cepa *S. aureus* ATCC 29213 se observó inhibición bacteriana con CMI de 125 μM para MetfV_{10} , 500 μM para NaV_{10} y 200 μM para NH_4V_{10} . Para las 2 cepas (100%) de *Enterococcus* sp., se observó inhibición con los compuestos asociados a V_{10} , para la cepa 1EcU se obtuvo una CMI de 62.5 μM para MetfV_{10} , 125 μM para NaV_{10} y 100 μM para

NH₄V₁₀. Para la cepa 1EcT, la CMI fue de 125 μM para MetfV₁₀, 250 μM para NaV₁₀ y 200 μM para NH₄V₁₀ (tabla 5).

CEPAS	CMI (μM)					
	Metf	NaVO ₃	NH ₄ VO ₃	MetfV ₁₀	NaV ₁₀	NH ₄ V ₁₀
<i>E.coli</i> ATCC 25922	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
1 Es U	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
1 Es D KI	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
2 Es D KI	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
1 Es D En	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
2 Es D En	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
1 Es T	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
1 KI U	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
2 KI U	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
1 KI D Es	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
2 KI D Es	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
1 En D Es	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
2 En D Es	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 500	> 500	> 500	125	500	200
1 Sc T	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>200
1 Ec U	> 500	> 500	> 500	62.5	125	100
1 Ec T	> 500	> 500	> 500	125	250	200

Tabla 8. CMI de decavanadatos. Los números **guinda** indican que las bacterias no fueron sensibles y los **morados** representan la inhibición de crecimiento bacteriano de los decavanadatos. Metf (Metformina), NaVO₃ (Metavanadato de sodio), NH₄VO₃ (Metavanadato de amonio), MetfV₁₀ (Decavanadato de metforminio), NaV₁₀ (Decavanadato de sodio), NH₄V₁₀ (Decavanadato de amonio), Ec (*Enterococcus*), Sc

(*Staphylococcus*), U (un microorganismo), D (dos microorganismos), T (Tres microorganismos).

CAPÍTULO 6

6. Discusión de resultados

Para este estudio se analizaron 960 especímenes urinarios, de los cuales 40 (4.2%) presentaron CIB's en el sedimento urinario. Utilizando la metodología de aislamiento (metodología 4.3 de este documento) se realizó el aislamiento y preservación de la CIB.

Sin embargo, de los 40 aislamientos realizados, en 16 (40%) no se observó crecimiento bacteriano, este resultado puede deberse a que, si bien intracelularmente las bacterias se encuentran con un medio rico en nutrientes, cuando la CIB se encuentra en estadio de alta reproducción, los nutrientes se ven agotados y por lo tanto para sobrevivir a este microambiente y ante el estrés originado por la su aislamiento, las bacterias pueden entrar en un estado conocido como “viable no cultivable” (VBNC, por sus siglas en inglés)^{75,76}. Este término se describió en 1982 en cepas de *E. coli* y *Vibrio cholerae* provenientes de muestras marinas⁷⁷. Una célula VBNC se encuentra viva, pero ha perdido la capacidad de crecer en medios de cultivo rutinarios^{75,76}. Las características que la difieren de una célula no viable son: membrana íntegra, información genética intacta, transcripción y producción continua de ARN mensajero (ARNm)⁷⁸. El estado VBNC se puede presentar en bacterias Gramnegativas en las que se ha observado el cambio morfológico de bacilar a cocoide y en bacterias Grampositivas, sin variabilidad morfológica⁷⁹. El número de especies bacterianas en que se ha descrito el estado VBNC varía desde 50 a 61, entre estas encontramos a *E. coli* y especies de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Salmonella* y *Pseudomonas*; agentes responsables de ITU's^{75,76,78}. El estado VBNC puede ser reversible mediante su resucitación,

al remover el factor estresante y promover un ambiente rico en nutrientes^{75,76,78,80}.

En la metodología de aislamiento (método LINU 11/2016/b6) se puede generar estrés osmótico y mecánico que pudieron repercutir en la viabilidad bacteriana. Por lo que, en este estudio como técnica de resucitación, estos factores estresantes se compensaron mediante la liberación de bacterias intracelulares en caldo BHI (medio de cultivo rico en nutrientes) y su incubación a 37°C por 30 minutos.

En este estudio *E. coli* fue el microorganismo que se aisló con mayor frecuencia (47.1%, figura 12). UPEC ha sido reconocido como el principal agente etiológico en ITU's complicadas y no complicadas^{41,43,48,81-89}. En tracto urinario las bacterias se enfrentan a un microambiente rico en nitrógeno, pobre en nutrientes, alta osmolaridad y con mayor respuesta inmune del hospedero⁹⁰. Por esta razón, para que la colonización en uretra y vejiga sea exitosa, los uropatógenos deben tener la capacidad de adaptarse a diferentes medios⁹⁰. UPEC tiene la capacidad de expresar factores de virulencia que le permiten invadir y colonizar el tracto urinario eficazmente. La expresión de adhesinas evita su expulsión del lumen durante la micción y por otra parte, la expresión de adhesinas Fim H y pili P son responsables de su internalización a células de urotelio. UPEC también libera sideróforos para captación de hierro y la liberación de toxinas; HlyA y CNF que ayudan a modular la respuesta inflamatoria^{84,85}.

Por otro lado, también se logró el aislamiento de *K. pneumoniae* (29.4%), *Enterococcus* sp. (5.9%), *Enterobacter* sp. (5.9%), *S. maltophilia* (5.9%), *S. aureus* (2.9%) y *P. rettgeri* (2.9%) (Figura 12). Flores *et al.*, describen que *K. pneumoniae* y *Enterococcus* sp. ocupan el segundo y tercer lugar como agentes responsables de ITU's complicadas y en quinto lugar se encuentra a *S. aureus*, seguido del hongo *C. albicans*⁴¹. Al igual que UPEC, todos los uropatógenos expresan adhesinas, toxinas, sideróforos, ureasa y genes de resistencia a los

antibióticos, con la capacidad de formar biopelículas, CIB's y QIR como factores de virulencia para una colonización exitosa⁸⁴. Para que una bacteria pueda llegar a formar CIB's, es indispensable la presencia de pili 1 y FimH, estas adhesinas han sido descritas en UPEC como modelo de estudio^{41,85-87}. Sin embargo, enterobacterias como *K. pneumonia*, *Enterobacter* sp. y *Citrobacter* sp forman CIB's vía FimH dependiente, por expresión de pili 1^{87,88}. En el estudio de CIB's, Scott *et al.*, lograron aislar a UPEC, *K. pneumonia* y *Enterococcus faecalis* de orinas de pacientes con CIB's, observadas en su sedimento urinario, sin embargo, no les fue posible asegurar que las aisladas provenían del interior de las células⁴⁹. En 2008 Rosen *et al.*, confirmaron en modelos murinos mediante inmunohistoquímica, que CIB's colonizadas por *K. pneumoniae* tenían la capacidad de expresar pili 1⁸⁹.

Por otra parte, en este estudio se obtuvieron 8 cultivos (33%) con crecimiento de dos bacterias diferentes provenientes de la misma CIB, las asociaciones encontradas fueron [*E. coli* - *Enterobacter* sp], [*E. coli* - *K. pneumoniae*] y [*K. pneumoniae* - *S. maltophilia*]. También se obtuvo 1 cultivo con crecimiento de 3 microorganismos proveniente de la misma CIB, con la asociación [*E. coli* - *Enterococcus* sp. - *S. aureus*]. En la práctica clínica el aislamiento de tres o más especies de microorganismos diferentes es considerado como contaminación uretral o vaginal en el proceso de toma de muestra, por lo que se solicita repetir el urocultivo como protocolo de calidad⁹¹⁻⁹³. A pesar de esto, recientemente se ha resaltado la importancia de infecciones polimicrobianas. En 1994, Igra *et al.*, realizaron estudios sobre interacciones polimicrobianas en ITU's y su relevancia en bacteremias, en el 32% de los casos se obtuvieron urocultivos polimicrobianos de pacientes ambulatorios. Los organismos que pudieron identificar fueron *E. coli* y especies de *Proteus*, *Providencia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Enterococcus*⁹⁴. Croxall *et al.*, en 2011 también realizaron estudios, en este caso con pacientes de la tercera edad y obtuvieron 200 urocultivos polimicrobianos con 2 a 5 agentes etiológicos aislados, siendo

E. coli y *E. faecalis* la mayor asociación en el 36% de los casos; otras bacterias encontradas fueron *P. aeruginosa*, *Proteus sp.* y *S. aureus*⁹⁵.

Posteriormente en 2012 Kline *et al.*, utilizando ratas como modelo de estudio, demostraron el sinergismo entre *Proteus sp.* con otros uropatógenos como *E. coli*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Providencia sp.*, encontrando también sinergismo entre *E. faecalis* con *P. aeruginosa*⁹⁶.

Cabe mencionar que de las 34 cepas obtenidas en 2 de ellas se identificó a *S. maltophilia* en asociación con *Klebsiella sp.* *S. maltophilia* es una bacteria Gramnegativa aeróbica que es generalmente resistente a una variedad de antibióticos, y que está asociada principalmente a infecciones respiratorias⁹⁷. Vartivarian *et al.*, identificaron la presencia de *S. maltophilia* en ITU's de pacientes inmunocomprometido⁹⁷, posteriormente (2015) Kumar *et al.*, aislaron a *S. maltophilia* de un paciente hospitalizado con inmunocompromiso, el cuál fue tratado previamente con antibióticos por una ITU causada por *K. pneumoniae*⁹⁸. Aunque no existe evidencia de que *S. maltophilia* tenga la capacidad de formar CIB's en tracto urinario, Pompilio *et al.*, observaron su adherencia e invasión celular en epitelio bronquial⁹⁹. Es por ello importante el estudiar la presencia de *S. maltophilia* en el proceso de ITU, ya sea como patógeno principal o en sinergismo con otros uropatógenos.

Del total de 34 cepas aisladas, 15 fueron seleccionadas para este trabajo con el propósito de representar a los principales uropatógenos. 12 cepas representaron a los Gramnegativos (enterobacterias) y 3 a los cocos Grampositivos. A las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213, y a las cepas en estudio se les realizó la CMI con antibióticos indicados para el tratamiento de ITU's^{39,57}. Las cepas ATCC se utilizaron como control de calidad de metodología, en los resultados la CMI obtenida de los antibióticos, cumplieron con los rangos establecidos en las guías M-100, 5-A del CLSI⁶⁷ (anexo 9.9). Posteriormente con las cepas provenientes de CIB's, los resultados

denotan que 13.3% fueron sensibles y 6.7% con sensibilidad intermedia a AMP, 50.0% sensibles y 25.0% con sensibilidad intermedia a CRO, 0 % sensibles y 0.0% con sensibilidad intermedia a AMK (Figura 14).

En cuanto a la resistencia antimicrobiana, 80.0% fueron resistentes a AMP, 25.0% a CRO y 100.0% a AMK (Figura 14). La exposición continua a antibióticos para el tratamiento de infecciones ha provocado cambios en los microorganismos en formas que reducen o eliminan la efectividad del dicho antibiótico, a este cambio se le ha descrito como resistencia antimicrobiana (RAM)^{100,101}. La crisis de RAM se ha atribuido a diferentes causas, entre los que destacan el mal uso o el uso excesivo de ellos. En muchos países los antibióticos no están regulados y se encuentran disponibles sin receta médica, la falta de regulación da como resultado antibióticos de fácil acceso y aunando la capacidad de comprarlos en línea, se facilita su uso excesivo⁷¹. De acuerdo a datos reportados por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) hasta el 50% de todos los antibióticos recetados no son necesarios o no son óptimamente efectivos según lo prescrito¹⁰². La indicación terapéutica, la elección del agente o la duración del tratamiento llega a ser incorrecta en un 30.0%-50.0% de los casos⁷¹. El Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobiano (GLASS por sus siglas en inglés), reportó que las bacterias resistentes más frecuentes son *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella sp*⁷⁰.

Por otro lado existen diversos estudios que analizan el porcentaje de resistencia de uropatógenos a los antimicrobianos. De estos resultados se destaca que un gran porcentaje de enterobacterias presentan alta resistencia a AMP (36.0%-66.0%) y en el caso de CRO Y AMK se reportan bajos porcentajes de resistencia (2.1%-15.6%)¹⁰³⁻¹⁰⁵. Para *Enterococcus sp.* se reportan porcentajes de resistencia a AMP menores al 30% (18.4%-23.8%)¹⁰⁵.

En este trabajo, los estudios de sensibilidad a los antibióticos indican que las cepas provenientes de cultivos con aislamiento de múltiples de la misma CIB, presentan mayor patrón de resistencia, sobre todo si esta asociación se da entre Gramnegativo-Grampositivo, por lo que es importante determinar si la cepa en estudio es de un mono o policultivo.

A las cepas obtenidas previamente, también se les determinó la CMI de los compuestos Metf, NaVO_3 y NH_4VO_3 como compuestos control y al NaV_{10} , NH_4V_{10} y MetfV_{10} como compuestos con probabilidad de acción antimicrobiana.

Si bien ya existen estudios de actividad antimicrobiana de decavanadatos, estos se han realizado a pH neutro³⁰⁻³³. De acuerdo a los estudios de Crans *et al.*, los compuestos de V sufren de especiación dependiendo del pH del medio¹⁵, esto influye en la determinación de la actividad antibacteriana. Por esta razón, en este estudio se realizaron pruebas de sensibilidad microbiana a pH de 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 (metodología 4.6). En los resultados se observa que a concentración 50 μM y a pH de 5.0 y 6.0, el NH_4V_{10} inhibe el crecimiento bacteriano; sin embargo, a pH 7.0 y 8.0 no se observa inhibición (Figura 13). De acuerdo con los estudios de especiación el V_{10} es estable a pH ácido (2.0-6.0), pero a pH mayor a 6.6 el ion se disocia y se forman otros oxovanadatos¹⁵. Por lo que al realizar las pruebas de sensibilidad a pH 7.0 y 8.0, la concentración de V_{10} disminuye¹⁵. Tomando en cuenta la influencia del pH en la especiación que impide asegurar que V_{10} sea el responsable de la actividad antibacteriana, el efecto antimicrobiano de los compuestos MetfV_{10} , NaV_{10} y NH_4V_{10} la CMI se determinó a pH de 5.0 y para Metf, NaVO_3 y NH_4VO_3 (compuestos control) se realizó al pH natural del medio de cultivo (6.8 ± 0.2) (metodología 4.7).

Durante el desarrollo de CMI para las 12 cepas de enterobacterias y la cepa *E. coli* ATCC 25922, ninguno de los compuestos asociados a V_{10} y sus compuestos control, inhibió el crecimiento bacteriano (tabla 5). El uso de metales como agentes terapéuticos se encuentra constantemente en

investigación, entre ellos se encuentra principalmente V. El parecido estructural del $(VO_4)^{3-}$ con el fosfato $(PO_4)^{3-}$ le permite interactuar con enzimas dependientes de fosfato lo que afecta al metabolismo bacteriano y lo que conllevaría a su muerte^{106,107}. En solución existen una gran variedad de especies de V, las cuáles van a depender del número de V y O presentes en la molécula¹⁵. También es posible encontrar diferencias en el efecto biológico dependiendo de la especie administrada. Una de las especies más estudiadas y con efectos terapéuticos prometedores es el V_{10} . Chen *et al.*, determinan la CMI del compuesto formado por V_{10} y quitosan frente a cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*, en el que reportan una fuerte actividad antimicrobiana (12.5 ppm), a su vez determinó la CMI con NH_4V_{10} en el que también denotan actividad moderada (50 ppm)³², estos resultados contrastan con lo obtenido en este trabajo. La discrepancia en los resultados obtenidos por ambos grupos de trabajo, puede deberse a una diferencia en la metodología realizada, ya que en el trabajo de Chen *et al.*, se determinó la CMI en medio sólido (difusión en agar) y nuestro grupo de trabajo en medio líquido (microdilución), siguiendo el método estandarizado por el CLSI (guía M-07).

Para las 3 cepas Grampositivas aisladas de CIB's y la cepa *S. aureus* ATCC 29213, los compuestos control no inhibieron su crecimiento, sin embargo, los tres compuestos asociados a V_{10} tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa *S. aureus* ATCC 29213 y las cepas de *Enterococcus* sp.; 1EcU y 1EcT (tabla 5).

En 2014, Sahani *et al.*, determinaron la CMI de tubos de oxovanadio y no observaron inhibición en bacterias Gramnegativas³⁰, sin embargo, reportaron resultados satisfactorios con bacterias Grampositivas. Si bien no existe un mecanismo de acción descrito por el cuál el V tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, Fukuda y Yamase probaron en 1997 diferentes concentraciones de un compuesto asociado a V_{10} en *S. pneumoniae* y observaron que cuando la concentración es menor a su CMI, se presentaban

células elongadas y cuando la concentración fue mayor se presentaban células hinchadas y lisadas. Estudios con rayos X de fluorescencia revelaron que tras 30 minutos de exposición a V se presentaba un eflujo de potasio (K^+). Estos resultados implicaban que la actividad antimicrobiana se da en la membrana celular donde se lleva a cabo el transporte de iones¹⁰⁸.

Pezza *et al.*, (2002) demostraron la capacidad de V_{10} de inhibir MutS en *E. coli* y *P. aeruginosa*¹⁰⁹. La proteína MutS forma parte del sistema de reparación del ADN por desajuste (MMR, por sus siglas en inglés) MutS también está presente en bacterias Grampositivas. Esta proteína es la encargada de reconocer el error post-replicación iniciando el sistema MMR¹¹⁰. En su estructura presenta una zona ATPasa en la que se encuentra incorporado el motivo Walker A (secuencia de aminoácidos específico para el anclaje de fosfato)¹⁰⁹. Por ende, Pezza *et al.*, propusieron que V_{10} mantiene interacciones cercanas al motivo Walker A (bucle P), más específicamente una vez formado el complejo [V_{10} -ADP-Mg-Proteína] por lo cual el cambio ATP/ADP permanece bloqueado. De lo anterior, se puede inferir que los tres compuestos asociados a V_{10} , pudieran actuar de la misma forma con ATPasas ABC (ATP-binding cassette) presentes en las cepas estudiadas, donde la secuencia aminoacídica del bucle P es muy parecida a la de MutS¹⁰⁹.

Las ATPasas ABC son proteínas transmembrana que funcionan como exportadoras o importadoras de solutos. En su estructura se caracterizan por tener dos dominios transmembrana (TMD's) y dos dominios citoplasmáticos de unión a nucleótidos (NBD's), en estos dominios se encuentran ubicados el motivo Walker A, donde se unen e hidrolizan ATP^{111,112}. En el caso de las bacterias se estima que V_{10} tenga el mismo efecto inhibitorio en estas proteínas como en MutS. Por otra parte, entre los importadores ABC se encuentra la subfamilia ECF (energy-coupling factor), este tipo de transportadores se han caracterizado por su capacidad de transportar metales como níquel y cobalto¹¹³. Esto nos permite inferir que pudieran funcionar como proteína transportadora de V

al citoplasma. A su vez, los transportadores ECF se encuentran con mayor abundancia en bacterias Grampositivas y escasas en Gramnegativas¹¹³, lo que puede explicar la mejor susceptibilidad de estas a los decavanadatos.

Las bacterias Gramnegativas están conformadas por una membrana interna, una pared celular delgada y una membrana externa gruesa. En cambio, las bacterias Grampositivas están formadas por una membrana interna y una pared celular gruesa. Esta pared está constituida por ácidos teicoicos, ácidos lipoteicoicos y mureína. La mureína es una red formada de pequeños péptidos y uniones entre N-acetilglucosamina y N-acetilmureína (carbohidratos)¹¹⁵⁻¹¹⁸. En 1988, Tracy y Gresser observaron la capacidad de $(VO_4)^{-3}$ de formar esteres de vandato acíclicos y cíclicos mediante su enlace con el grupo hidroxilo de moléculas de seis miembros como los piranosidos y hexanodiolos¹¹⁹. Posteriormente en 2004, Ribeiro *et al.*, observaron la capacidad de $(VO_4)^{-3}$ de formar enlaces con derivados de glucosa¹²⁰. Estos estudios demuestran que es posible que el V interactúe con las hexosas presentes en la red de mureína de la pared bacteriana, manteniéndolo más cerca, lo que le permite efectuar mejor su actividad antimicrobiana que en bacterias Gramnegativas.

Por otra parte, en nuestro estudio se probaron tres decavanadatos diferentes; MetfV₁₀, NaV₁₀ y AmV₁₀. En los resultados obtenidos se observó que MetfV₁₀, presentó mejor actividad antimicrobiana que el clúster asociado a Na⁺ y (NH₄)⁺ (tabla 5). Los POM's son inestables en soluciones acuosas y tienden a convertirse en diferentes especies, sin embargo, estas estructuras pueden estabilizarse por medio de diferentes estrategias, principalmente su encapsulación¹²¹. Es decir, mientras más rodeado se encuentre un clúster, mayor estabilidad tendrá. Si bien el tipo de compuestos que le confieren estabilidad a los POM's son estructuras que forman micelas o compuestos orgánicos¹²². MetfV₁₀ tiene seis moléculas de metformina que rodean por

completo al V_{10} (Figura 9) confiriéndole mayor estabilidad que los iones Na^+ y $(\text{NH}_4)^+$, lo cual puede explicar su mejor efecto inhibitorio en bacterias.

CAPÍTULO 7

7.1 Conclusiones

- El pH 5.0 y 6.0 es el idóneo para realizar pruebas de sensibilidad microbiana de decavanadatos por microdilución.
- Las bacterias provenientes de CIB's presentaron 73.3% de resistencia a AMP, 53.8% a CRO y 15.4% a AMK.
- Ninguno de los compuestos control (Metf, NaVO_3 y NH_4VO_3) inhibieron el crecimiento bacteriano.
- MetfV_{10} no presentó actividad antimicrobiana a una concentración de $500\mu\text{M}$, en la cepa de *E. coli* ATCC 25922, en la cepa de *S. aureus* (1ScT) y bacterias Gramnegativas aisladas de CIB's de orinas de pacientes con bacteriuria.
- MetfV_{10} presentó actividad antimicrobiana con CMI de $125\mu\text{M}$ en la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, $62.5\mu\text{M}$ en 1EcU y $125\mu\text{M}$ en 1EcT, ambas cepas *Enterococcus sp.* aisladas de CIB's.
- La CMI obtenida de MetfV_{10} ($62.5\mu\text{M}$, $125\mu\text{M}$ y $>500\mu\text{M}$) en cepas provenientes de CIB's se encuentran por encima de la concentración máxima segura administrable de V en humanos ($10\mu\text{M}$).
- No se logró determinar la CMI de CitV_{10} por su insolubilidad en medio acuoso.

7.2 Perspectivas

- Determinar solventes adecuados para los compuestos insolubles en agua como CitV₁₀, que mantenga la estabilidad de los decavanadatos y no afecte el crecimiento bacteriano.
- Realizar estudios que permitan comprobar las especies de V presentes en las diferentes fases del estudio.
- Asociar al V₁₀ con otros fármacos que permitan reducir la CMI a concentraciones adecuadas para su uso como antibiótico.

8. Referencias

1. Tsiani, E., & Fantus, I. G. (1997). Vanadium compounds: biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 8(2), 51-58.
2. Pourret, O., & Dia, A. (2016). Vanadium. *Encyclopedia of Geochemistry: A Comprehensive Reference Source on the Chemistry of the Earth*, 1-3.
3. Guevara-García, J.A. y Scior, T. (Coordinadores). La Investigación del Vanadio en la BUAP. Serie Textos Científicos. Primera Edición 2014. Editorial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. 175 pp. ISBN 978-607-487-748-9.
4. Imtiaz, M., Rizwan, M. S., Xiong, S., Li, H., Ashraf, M., Shahzad, S. M., & Tu, S. (2015). Vanadium, recent advancements and research prospects: a review. *Environment international*, 80, 79-88.
5. WebElements, <https://www.webelements.com>
6. Aureliano, M. (2017). The role of decavanadate in anti-tumor activity. *Global Journal of Cancer Therapy*, 3(1), 12-14.
7. Aureliano, M., & Crans, D. C. (2009). Decavanadate (V₁₀O₂₈⁶⁻) and oxovanadates: oxometalates with many biological activities. *Journal of inorganic biochemistry*, 103(4), 536-546.
8. Reyes, J. M. O., Galindo, A. S., López, L. I. L., & Facio, A. C. (2015). Evaluación de la actividad antimicrobiana del trióxido de molibdeno MoO₃. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(4), 25-30.
9. Kovala-Demertzi, D., Domopoulou, A., Demertzis, M. A., Papageorgiou, A., & West, D. X. (1997). Palladium (II) complexes of 2-acetylpyridine N (4)-propyl, N (4)-dipropyl-and 3-hexamethyleneiminylthiosemicarbazones with potentially interesting biological activity. Synthesis, spectral properties, antifungal and in vitro antitumor activity. *Polyhedron*, 16(20), 3625-3633.

10. Treviño, S., Sánchez-Lara, E., Sarmiento-Ortega, V. E., Sánchez-Lombardo, I., Flores-Hernández, J. Á., Pérez-Benítez, A., & González-Vergara, E. (2015). Hypoglycemic, lipid-lowering and metabolic regulation activities of metforminium decavanadate $(\text{H}_2\text{Metf})_3[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ using hypercaloric-induced carbohydrate and lipid deregulation in Wistar rats as biological model. *Journal of inorganic biochemistry*, 147, 85-92.
11. Aureliano M., F. C. T. (2011). Recent perspectives into biochemistry of decavanadate. *World journal of biological chemistry*, 2(10), 215.
12. Aureliano, M. (2016). Decavanadate toxicology and pharmacological activities: V10 or V1, both or none?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
13. Doucette, K. A., Hassell, K. N., & Crans, D. C. (2016). Selective speciation improves efficacy and lowers toxicity of platinum anticancer and vanadium antidiabetic drugs. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 165, 56-70.
14. Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L. G., Muntau, H., van Leeuwen, H. P., & Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and applied chemistry*, 72(8), 1453-1470.
15. Crans, D. C., Woll, K. A., Prusinskas, K., Johnson, M. D., & Norkus, E. (2013). Metal speciation in health and medicine represented by iron and vanadium. *Inorganic chemistry*, 52(21), 12262-12275.
16. Treviño, S., Díaz, A., Sánchez-Lara, E., Sanchez-Gaytan, B. L., Perez-Aguilar, J. M., & González-Vergara, E. (2018). Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. *Biological Trace Element Research*, 1-31.
17. Rehder, D. (2015). The role of vanadium in biology. *Metallomics*, 7(5), 730-742.

18. Sakurai, H., Kojima, Y., Yoshikawa, Y., Kawabe, K., & Yasui, H. (2002). Antidiabetic vanadium (IV) and zinc (II) complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 226(1), 187-198.
19. Yraola, F., García-Vicente, S., Marti, L., Albericio, F., Zorzano, A., & Royo, M. (2007). Understanding the mechanism of action of the novel SSAO substrate (C₇NH₁₀)₆ (V₁₀O₂₈)·2H₂O, a prodrug of peroxovanadate insulin mimetics. *Chemical biology & drug design*, 69(6), 423-428.
20. Dong, Y., Narla, R. K., Sudbeck, E., & Uckun, F. M. (2000). Synthesis, X-ray structure, and anti-leukemic activity of oxovanadium (IV) complexes. *Journal of inorganic biochemistry*, 78(4), 321-330.
21. Narla, R. K., Dong, Y., Klis, D., & Uckun, F. M. (2001). Bis (4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline) sulfatoxovanadium (IV) as a novel antileukemic agent with matrix metalloproteinase inhibitory activity. *Clinical cancer research*, 7(4), 1094-1101.
22. Rosu, T., Negoiu, M., Pasculescu, S., Pahontu, E., Poirier, D., & Gulea, A. (2010). Metal-based biologically active agents: Synthesis, characterization, antibacterial and antileukemia activity evaluation of Cu (II), V (IV) and Ni (II) complexes with antipyrine-derived compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(2), 774-781.
23. Zhai, F., Wang, X., Li, D., Zhang, H., Li, R., & Song, L. (2009). Synthesis and biological evaluation of decavanadate Na₄Co (H₂O)₆V₁₀O₂₈·18H₂O. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63(1), 51-55.
24. Maia, P. I. D. S., Pavan, F. R., Leite, C. Q., Lemos, S. S., de Sousa, G. F., Batista, A. A., & Deflon, V. M. (2009). Vanadium complexes with thiosemicarbazones: synthesis, characterization, crystal structures and anti-Myco bacterium tuberculosis activity. *Polyhedron*, 28(2), 398-406.
25. Correia, I., Adao, P., Roy, S., Wahba, M., Matos, C., Maurya, M. R., & Pessoa, J. C. (2014). Hydroxyquinoline derived vanadium (IV and V) and

- copper (II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. *Journal of inorganic biochemistry*, 141, 83-93.
26. Christensen, A. T., McLauchlan, C. C., Dolbecq, A., Mialane, P., & Jones, M. A. (2016). Studies of the effectiveness of bisphosphonate and vanadium-bisphosphonate compounds in vitro against axenic *Leishmania tarentolae*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
27. Maurya, M. R., Khurana, S., Azam, A., Zhang, W., & Rehder, D. (2003). Synthesis, Characterisation and Antiamoebic Studies of Dioxovanadium (v) Complexes Containing ONS Donor Ligands Derived from S-Benzylidithiocarbamate. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2003(10), 1966-1973.
28. Maurya, M. R., Khan, A. A., Azam, A., Ranjan, S., Mondal, N., Kumar, A., & Pessoa, J. C. (2010). Vanadium complexes having [VIVO] 2+ and [VVO 2]+ cores with binucleating dibasic tetradentate ligands: Synthesis, characterization, catalytic and antiamoebic activities. *Dalton Transactions*, 39(5), 1345-1360.
29. Maqsood, Z. T., Khan, K. M., Ashiq, U., Jamal, R. A., Chohan, Z. H., Mahroof-Tahir, M., & Supuran, C. T. (2006). Oxovanadium (IV) complexes of hydrazides: potential antifungal agents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 21(1), 37-42.
30. Sahani, M. K., Yadava, U., Pandey, O. P., & Sengupta, S. K. (2014). Synthesis, spectral characterization and antimicrobial studies of nano-sized oxovanadium (IV) complexes with Schiff bases derived from 5-(phenyl/substituted phenyl)-2-hydrazino-1, 3, 4-thiadiazole and indoline-2, 3-dione. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 125, 189-194.
31. Diggikar, R. S., Patil, R. H., Kale, S. B., Thombre, D. K., Gade, W. N., Kulkarni, M. V., & Kale, B. B. (2013). Silver-decorated orthorhombic

- nanotubes of lithium vanadium oxide: an impeder of bacterial growth and biofilm. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(18), 8283-8290.
32. Chen, S., Wu, G., Long, D., & Liu, Y. (2006). Preparation, characterization and antibacterial activity of [chitosan–Ca₃ (V₁₀O₂₈)] complex-membrane. *Carbohydrate polymers*, 64(1), 92-97.
33. Toumi, S., Ratel-Ramond, N., Akriche, S. (2015). Decavanadate cage-like cluster templated by organic counter cation: synthesis, characterization and its antimicrobial effect against Grampositive *E. feacium*. *Journal of Cluster Science*, 26(5), 1821-1831.
34. Soazo, M., & Garcia, G. B. (2007). Vanadium exposure through lactation produces behavioral alterations and CNS myelin deficit in neonatal rats. *Neurotoxicology and teratology*, 29(4), 503-510.
35. Aureliano, M., & Ohlin, C. A. (2014). Decavanadate in vitro and in vivo effects: facts and opinions. *Journal of inorganic biochemistry*, 137, 123-130.
36. Venkataraman, B. V., & Sudha, S. (2005). Vanadium toxicity. *Asian J Exp Sci*, 19(2), 127-134.
37. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2012. Toxicological profile for Vanadium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
38. Boulassel, B., Sadeg, N., Roussel, O., Perrin, M., & Belhadj-Tahar, H. (2011). Fatal poisoning by vanadium. *Forensic science international*, 206(1), e79-e81.
39. Guía de práctica clínica. Diagnóstico y Tratamiento de la Infección Aguda, no Complicada del Tracto Urinario en la Mujer, Consejo de Salubridad General, México. Disponible en:
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/077_GP_C_InfAgnocompdeltractourinariomujer/GPCRAPIDAtractourinario.pdf
40. Ekwealor, P. A., Ugwu, M. C., Ezeobi, I., Amalukwe, G., Ugwu, B. C., Okezie, U., & Esimone, C. (2016). Antimicrobial Evaluation of Bacterial

- Isolates from Urine Specimen of Patients with Complaints of Urinary Tract Infections in Awka, Nigeria. *International Journal of Microbiology*, 2016.
41. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269-284.
 42. Ulett, G. C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A. J., Sweet, M. J., & Schembri, M. A. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current opinion in microbiology*, 16(1), 100-107.
 43. Seema, M., Madhu, S., & Uma, C. (2015). Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens and global health*, 109(1), 26-29.
 44. Stefaniuk, E., Suchocka, U., Bosacka, K., & Hryniewicz, W. (2016). Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community-acquired urinary tract infections in Poland. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1-7.
 45. Waldhuber A., Puthia M., Wieser A., Cirl C., Dürr S., Neumann S., Albrecht S., RömmLer F., Müller T., Zheng Y., Schuber S., Gro O., Svanborg C., & Miethke T. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 disrupts NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 11, pp. 1-14.
 46. Conover, M. S., Hadjifrangiskou, M., Palermo, J. J., Hibbing, M. E., Dodson, K. W., & Hultgren, S. J. (2016). Metabolic requirements of *Escherichia coli* in intracellular bacterial communities during urinary tract infection pathogenesis. *mBio*, 7(2), e00104-16.
 47. Hadifar, S., Moghoofei, M., Nematollahi, S., Ramazanzadeh, R., Sedighi, M., Salehi-Abargouei, A., & Miri, A. (2016). Epidemiology of Multi Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: a Systematic Review

48. Barber, A. E., Norton, J. P., Spivak, A. M., & Mulvey, M. A. (2013). Urinary tract infections: current and emerging management strategies. *Clinical infectious diseases*, 57(5), 719-724.
49. Scott, V. C., Haake, D. A., Churchill, B. M., Justice, S. S., & Kim, J. H. (2015). Intracellular bacterial communities: a potential etiology for chronic lower urinary tract symptoms. *Urology*, 86(3), 425-431.
50. Justice, S. S., Hunstad, D. A., Cegelski, L., & Hultgren, S. J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 162-168.
51. Sarah, S., G., & Deborah, T., H. (2013). Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*, 4(4), 273-283.
52. Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información, Secretaria de Salud (2015): Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad. Disponible en:
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2017/morbilidad/nacional/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf
53. Tabasi, M., Karam, M. R. A., Habibi, M., Yekaninejad, M. S., & Bouzari, S. (2015). Phenotypic assays to determine virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance pattern. *Osong public health and research perspectives*, 6(4), 261-268.
54. Bouchillon, S. K., Badal, R. E., Hoban, D. J., & Hawser, S. P. (2013). Antimicrobial susceptibility of inpatient urinary tract isolates of Gram-negative bacilli in the United States: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program: 2009–2011. *Clinical therapeutics*, 35(6), 872-877.

55. Paredes, F., & Roca, J. J. (2004). Acción de los antibióticos: Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm: farmacia y sociedad*, 23(3), 116-124.
56. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423.
57. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 116-129.
58. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.
59. Carlet, J., Collignon, P., Goldmann, D., Goossens, H., Gyssens, I. C., Harbarth, S., & Richtmann, R. (2011). Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *The Lancet*, 378(9788), 369-371.
60. Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), 42.
61. Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 287-292.
62. Lawrence, J. G. (1999). Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Current opinion in microbiology*, 2(5), 519-523.
63. Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 711.
64. Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S347-S357.
65. Zaragosa, R. (2007). Microbiología aplicada al paciente crítico. *Madrid: Panamericana*

66. Wayne, P. A. (2009). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; CLSI document M07-A7. *Approved Standard. Eighth Edition ed: Clinical and Laboratory Standards Institute.*
67. Wayne, P. A. (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. *CLSI document M100-S20.*
68. Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información, Secretaria de Salud (2015): Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad. Disponible en:
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/nacional/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf
69. Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información, Secretaria de Salud (2016): Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad. Disponible en:
http://187.191.75.115/anuario/2016/morbilidad/nacional/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf
70. Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, 40(4), 277.
71. Pompilio, A., Crocetta, V., Confalone, P., Nicoletti, M., Petrucca, A., Guarnieri, S., & Di Bonaventura, G. (2010). Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC microbiology*, 10(1), 102.
72. Todorović, M. R., Mioč, U. B., Holclajtner-Antunović, I., & Šegan, D. (2005). Synthesis and characterization of ammonium Decavanadate (V). In *Materials Science Forum* (Vol. 494, pp. 351-356). Trans Tech Publications.

73. Hartung, S., Bucher, N., Chen, H. Y., Al-Oweini, R., Sreejith, S., Borah, P., & Srinivasan, M. (2015). Vanadium-based polyoxometalate as new material for sodium-ion battery anodes. *Journal of Power Sources*, 288, 270-277.
74. Sánchez-Lara, E., Treviño, S., Sánchez Gaytán, B. L., Sánchez-Mora, E., Castro, M. E., Meléndez-Bustamante, F. J., & González-Vergara, E. (2018). Decavanadate Salts of Cytosine and Metformin: A Combined Experimental-Theoretical Study of Potential Metallodrugs Against Diabetes and Cancer. *Frontiers in chemistry*, 6, 402.
75. Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43(1), 93-100.
76. Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34(4), 415-425.
77. Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial ecology*, 8(4), 313-323.
78. Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 5, 258.
79. Signoretto, C., del Mar Lleò, M., Tafi, M. C., & Canepari, P. (2000). Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(5), 1953-1959.
80. Pienaar, J. A., Singh, A., & Barnard, T. G. (2016). The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review. *African journal of laboratory medicine*, 5(1), 1-9.
81. Anderson, G. G., Goller, C. C., Justice, S., Hultgren, S. J., & Seed, P. C. (2010). Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infection and immunity*, 78(3), 963-975.

82. Römling, U., Kjelleberg, S., Normark, S., Nyman, L., Uhlin, B. E., & Åkerlund, B. (2014). Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of internal medicine*, 276(2), 98-110.
83. Verma, A., Bhani, D., Tomar, V., Bachhiwal, R., & Yadav, S. (2016). Differences in bacterial colonization and biofilm formation property of uropathogens between the two most commonly used indwelling urinary catheters. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(6), PC01.
84. Chanyi, R., Burton, J. P., & Cadieux, P. A. (2016). Pathogenic Mechanisms of Uropathogens. In *The Role of Bacteria in Urology* (pp. 21-32). Springer, Cham.
85. Ejrnæs, K. (2011). Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull*, 58(4), B4187.
86. Anderson, G. G., Martin, S. M., & Hultgren, S. J. (2004). Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes and infection*, 6(12), 1094-1101.
87. Hannan, T. J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A., & Hultgren, S. J. (2012). Host–pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS microbiology reviews*, 36(3), 616-648.
88. Rosen, D. A., Hooton, T. M., Stamm, W. E., Humphrey, P. A., & Hultgren, S. J. (2007). Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS medicine*, 4(12), e329.
89. Rosen, D. A., Pinkner, J. S., Jones, J. M., Walker, J. N., Clegg, S., & Hultgren, S. J. (2008). Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. *Infection and immunity*, 76(7), 3337-3345.

90. Alteri, C. J., & Mobley, H. L. (2012). *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. *Current opinion in microbiology*, 15(1), 3-9.
91. de Cueto, M. (2005). Diagnóstico microbiológico de la infección del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23, 9-14.
92. Esparza, G. F., Mota, G., Robledo, C., & Villegas, M. V. (2015). Aspectos microbiológicos en el diagnóstico de infecciones del tracto urinario. *Infectio*, 19(4), 150-160.
93. Kline, K. A., & Lewis, A. L. (2016). Gram-positive uropathogens, polymicrobial urinary tract infection, and the emerging microbiota of the urinary tract. *Microbiology spectrum*, 4(2).
94. Siegman-Igra, Y., Kulka, T., Schwartz, D., & Konforti, N. (1994). Polymicrobial and monomicrobial bacteraemic urinary tract infection. *Journal of hospital infection*, 28(1), 49-56.
95. Croxall, G., Weston, V., Joseph, S., Manning, G., Cheetham, P., & McNally, A. (2011). Increased human pathogenic potential of *Escherichia coli* from polymicrobial urinary tract infections in comparison to isolates from monomicrobial culture samples. *Journal of medical microbiology*, 60(1), 102-109.
96. Kline, K. A., Schwartz, D. J., Gilbert, N. M., Hultgren, S. J., & Lewis, A. L. (2012). Immune modulation by group B *Streptococcus* influences host susceptibility to urinary tract infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 80(12), 4186-4194.
97. Vartivarian, S. E., Papadakis, K. A., & Anaissie, E. J. (1996). *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* urinary tract infection: a

- disease that is usually severe and complicated. *Archives of internal medicine*, 156(4), 433-435.
98. Kumar, S., Bandyopadhyay, M., Chatterjee, M., Banerjee, P., Poddar, S., & Banerjee, D. (2015). *Stenotrophomonas maltophilia*: complicating treatment of ESBL UTI. *Advanced biomedical research*, 4.
99. Organización Mundial de la Salud, (2018). *Resistencia a los antimicrobianos*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
100. Read, A. F., & Woods, R. J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, medicine, and public health*, 2014(1), 147.
101. Centers for Disease Control and Prevention, (2018). *About antimicrobial resistance*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
102. Organización Mundial de la Salud, (2018). *Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo*. Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>
103. Gaspari, R. J., Dickson, E., Karlowsky, J., & Doern, G. (2005). Antibiotic resistance trends in paediatric uropathogens. *International journal of antimicrobial agents*, 26(4), 267-271.
104. Lopardo, G., Fridman, D., Gonzalez Arzac, M., Calmaggi, A., Smayevsky, J., Podesta, O., & Clara, L. (2007). Uropathogen resistance: are laboratory-generated data reliable enough?. *Journal of chemotherapy*, 19(1), 33-37.

105. Maraki, S., Mantadakis, E., Michailidis, L., & Samonis, G. (2013). Changing antibiotic susceptibilities of community-acquired uropathogens in Greece, 2005–2010. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(3), 202-209.
106. Irving, E., & Stoker, A. (2017). Vanadium compounds as PTP inhibitors. *Molecules*, 22(12), 2269.
107. Bijelic, A., Aureliano, M., & Rompel, A. (2018). The antibacterial activity of polyoxometalates: structures, antibiotic effects and future perspectives. *Chemical Communications*, 54(10), 1153-1169.
108. Fukuda, N., & Yamase, T. (1997). In vitro antibacterial activity of vanadate and vanadyl compounds against *Streptococcus pneumoniae*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 20(8), 927-930.
109. Pezza, R. J., Villarreal, M. A., Montich, G. G., & Argaraña, C. E. (2002). Vanadate inhibits the ATPase activity and DNA binding capability of bacterial MutS. A structural model for the vanadate–MutS interaction at the Walker A motif. *Nucleic acids research*, 30(21), 4700-4708.
110. Lenhart, J. S., Pillon, M. C., Guarné, A., Biteen, J. S., & Simmons, L. A. (2016). Mismatch repair in Gram-positive bacteria. *Research in microbiology*, 167(1), 4-12.
111. Fath, M. J., & Kolter, R. (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological reviews*, 57(4), 995-1017.
112. Hollenstein, K., Dawson, R. J., & Locher, K. P. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current opinion in structural biology*, 17(4), 412-418.

- 113.**Cui, J., & Davidson, A. L. (2011). ABC solute importers in bacteria. *Essays in biochemistry*, 50, 85-99.
- 114.**Scheffers, D. J., & Pinho, M. G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69(4), 585-607.
- 115.**Cabeen, M. T., & Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 601.
- 116.**Dmitriev, B., Toukach, F., & Ehlers, S. (2005). Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends in microbiology*, 13(12), 569-574.
- 117.**Scheffers, D. J., & Pinho, M. G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69(4), 585-607.
- 118.**Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A., & Vollmer, W. (2012). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2), 123.
- 119.**Tracey, A. S., & Gresser, M. J. (1988). Vanadium (V) oxyanions. Interactions of vanadate with cyclic diols and monosaccharides. *Inorganic Chemistry*, 27(15), 2695-2702.
- 120.**Ribeiro, A. C., Valente, A. J., Lobo, V. M., Azevedo, E. F., Amado, A. M., Da Costa, A. A., & Burrows, H. D. (2004). Interactions of vanadates with carbohydrates in aqueous solutions. *Journal of molecular structure*, 703(1-3), 93-101.
- 121.**Wu, L., & Liang, J. (2017). Polyoxometalates and Their Complexes Toward Biological Application. In *Supramolecular Chemistry of Biomimetic Systems* (pp. 311-354). Springer, Singapore.

122. Fu, D. Y., Zhang, S., Qu, Z., Yu, X., Wu, Y., & Wu, L. (2018). Hybrid assembly toward enhanced thermal stability of virus-like particles and antibacterial activity of Polyoxometalates. *ACS applied materials & interfaces*, 10(7), 6137-6145.

9. Anexos

9.1 Protocolo de aislamiento de CIB's [LINU 2016]

1. Limpieza

- 1.1 Limpiar la superficie de trabajo con alcohol al 70%
- 1.2 Limpiar la superficie del microscopio y el Bioraptor con alcohol al 70%
- 1.3 Con la ayuda de mecheros generar un área de esterilidad para el microscopio

2. Aislamiento de CIB

2.1 Encendido del Bioraptor

- 2.1.1 Cambie el interruptor a modo encendido, el equipo encenderá las luces indicadoras del panel de control, verifique que el ventilador y las luces funcionen correctamente
- 2.1.2. Verifique que el aparato se encuentra en la posición HOME (inicio) las luces indicadoras en los botones -X y -Y se encontrarán encendidas
- 2.1.3 Cambie el interruptor Home/Go a la posición Go

2.2 Operación

2.2.1 Deposito del espécimen

- Tomar una punta estéril y colocarla en la micropipeta semiautomática de 5 μ L
- Tomar 5 μ L. del sedimento (sin teñir) y colocarlo en un portaobjeto estéril
- Colocar una punta estéril en la micropipeta semiautomática de 10 μ L, tomar 10 μ L de caldo BHI, mezclarlo con los 5 μ L del sedimento
- Homogenizar con la micropipeta semiautomática
- Colocar el portaobjetos con la mezcla en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo de menor aumento (10X) e identificar las CIB

2.2.2 Colocar la micropipeta (0-3 μ L) en el adaptador para micropipeta

- 2.2.3 Acercar el brazo portapipeta a la platina con la perilla de ajuste Z, regular a una altura de 0.5 cm por encima de la platina

- 2.2.4 Colocar la punta de la micropipeta a 3 mm de la mezcla del espécimen y con la perilla de ajuste del ángulo de micropipeta toque el portaobjetos
- 2.2.5 Con los botones de desplazamiento (X,Y) localizar en el campo de observación la micropipeta e identificar la CIB
- 2.3 Regular la velocidad de avance durante el acercamiento a la CIB utilizando la palanca de ajuste de velocidad, cuando se encuentre la micropipeta a 5 micras de la CIB detener el desplazamiento
- 2.4 Posicionar la perilla de velocidad de flujo al 50% y con ayuda del botón IN succionar la CIB
- 2.5 Bajar la platina del microscopio y mover el portaobjetos hacia la derecha para realizar un lavado de la célula
- 2.6 Colocar con una punta estéril 10 μ L de caldo BHI y posicionar en la platina del microscopio
- 2.7 Subir la platina y acercar el brazo portapipeta a la platina, con la perilla de ajuste Z regular a una altura de 0.5 cm por encima de la platina
- 2.8 Colocar la punta de la micropipeta a 3 mm de los 10 μ L de caldo BHI y con la perilla de ajuste del ángulo de micropipeta toque el portaobjetos
- 2.9 Con los botones de desplazamiento (X,Y) localizar en el campo de observación la micropipeta y con ayuda del botón OUT expulse el contenido de la micropipeta
- 2.10 Para realizar mayor aislamiento repita desde el paso 3 al 12. Dejar de aislar hasta que se observe la CIB sin bacterias planctónicas

3. Siembra de la CIB

- 3.1 En el último aislamiento dejar la CIB en la micropipeta y depositar el contenido en un tubo eppendorf estéril con 200 μ L de caldo BHI
- 3.2 Incubar a 37 °C durante 15 minutos
- 3.3 Someter la muestra a vortex por 30 segundos a 45 Hz para provocar la lisis celular, liberando las bacterias en el medio

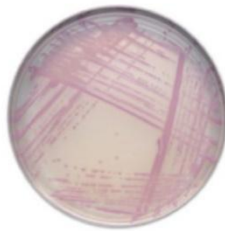
- 3.4** Incubar a 37 °C durante 15 minutos
- 3.5** Depositar los 200 µL de caldo BHI en la superficie de una placa CHROMagar orientación, realizando un extendido con varilla homogéneamente e incubar a 37 °C por 18 a 24 horas
- 3.6** Interpretar contando el número de colonias observadas

9.2 Identificación de bacterias en CHROMagar orientación

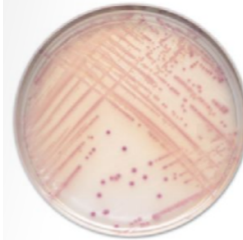
BBL™ CHROMagar™ Orientation Gram Positives and Gram Negatives in Living Color*

Organism	Total no. of isolates	No. (%) of isolates with described color	Description of pigment and/or morphology of colonies
<i>Escherichia coli</i>	429	425 (99) 4 (1)	pink beige
<i>Enterococcus spp.</i>	213	213 (100)	blue or turquoise, small
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	6	6 (100)	pink opaque
<i>Streptococcus agalactiae</i>	36	36 (100)	light blue, pin-like
<i>Citrobacter spp.</i>	16	14 (87.5) 2 (22.5)	metallic blue with or without pink halo pink
<i>Enterobacter spp.</i>	17	17 (100)	metallic blue with or without pink halo
<i>Klebsiella</i>	96	96 (100)	metallic blue with or without pink halo
<i>Morganella morganii</i>	7	7 (100)	colorless to beige with brown halo
<i>Proteus mirabilis</i>	61	61 (100)	beige with brown halo
<i>Proteus vulgaris</i>	5	3 (60) 2 (40)	beige with brown halo blue-green with brown halo
<i>Providencia spp.</i>	16	16 (100)	beige with brown halo
<i>Acinetobacter spp.</i>	2	2 (100)	beige
<i>Candida spp.</i>	31	31 (100)	white, creamy, convex
<i>Hafnia alvei</i>	3	2 (66.7) 1 (33.3)	beige pink with blue halo
<i>Pseudomonas spp.</i>	57	53 (93) 4 (7)	transparent, yellow to green serrated edge, diffused beige with or without green halo
<i>Salmonella spp.</i>	1	1 (100)	beige
<i>Serratia marcescens</i>	6	6 (100)	blue-green
<i>Staphylococcus spp.</i>	19	19 (100)	golden opaque, white, pink

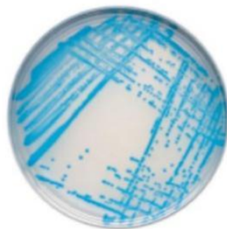
S. saprophyticus on CHROMagar



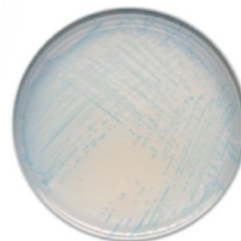
E. coli on CHROMagar



Enterococci on CHROMagar



grp. B. streptococci on CHROMagar



9.3 Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias

Medio de cultivo	Indicador	Prueba	Interpretación
TSI hierro triple azúcar	Rojo fenol	Fermentación de glucosa	P: Vire del fondo a amarillo
			N: Permanece fondo rojo
		Utilización de lactosa	P: Vire de la punta a amarillo
			N: Permanece punta roja
Producción de SH ₂	P: Ennegrecimiento del medio		
	N: Ausencia ennegrecimiento		
Producción de gas	Formación de burbujas o desprendimiento del agar de las paredes del tubo		
	LIA lisina hierro	Púrpura de bromocresol	Descarboxilación de lisina
N: Mantiene punta violeta y vire del fondo a amarillo			
Desaminación de lisina			P: Vire medio a rojo
	N: Ausencia de color rojo		
Producción de SH ₂	P: Ennegrecimiento del medio		
	N: Ausencia ennegrecimiento		
MIO movilidad indol ornitina	Púrpura de bromocresol	Movilidad	P: Enturbiamiento del medio
			N: Crecimiento en la zona de picadura
		Producción de Indol	P: Anillo rojo
			N: Anillo amarillo
Descarboxilación de ornitina	P: Permanece medio violeta		
	N: Vire del medio a amarillo		
Christensen	Rojo fenol	Producción de ureasa	P: Vire del medio a rosa
			N: Mantiene medio amarillo
Citrato Simmons	Azul de bromotimol	Utilización de citrato	P: Crecimiento en punta y vire del medio a azul
			N: Sin crecimiento en punta y mantiene medio verde

Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias. SH₂ (Ácido sulfhídrico), P (Positivo), N (Negativo).

Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.

Prats, G. (2006). *Microbiología clínica*. Ed. Médica Panamericana.

Fundamento TSI

Degradación de azúcares

La fermentación de glucosa acidifica la base provocando vire del medio a amarillo, la punta es neutralizada por las peptonas presentes en el medio, manteniendo su color rojo. Sin embargo, cuando hay utilización de lactosa la acidificación es diez veces mayor y por lo tanto no hay neutralización, provocando el vire del medio por completo a amarillo.

Producción de SH₂

El medio detecta la producción de SH₂ por la reducción de tiosulfato, ya que se combina con el citrato amónico férrico de medio para dar lugar a un precipitado negro.

Fundamento LIA

Descarboxilación y desaminación de lisina

La fermentación de glucosa produce catabolitos ácidos, por lo que la base vira a amarillo. Si la lisina se descarboxila produce catabolitos alcalinos (cadaverina) que neutralizan el medio). La desaminación alcaliniza con mayor intensidad y el medio vira a rojo.

Producción de SH₂

Misma que la descrita para TSI

Fundamento MIO

Descarboxilación de ornitina

Utiliza el azúcar del medio acidificándolo y por lo tanto el medio vira a amarillo. La descarboxilación de ornitina alcaliniza el medio compensando la acidez, por lo que el medio no vira de color.

Movilidad

Al ser un medio semisólido permite que las bacterias móviles se dispersen por todo el medio, lo que se refleja por la turbidez del medio. Cuando las bacterias son inmóviles, no difunden, por lo que solo crecen en la zona de inoculación.

Indol

El indol, un bencilpirrol, es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que tienen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano, con producción de indol, ácido pirúvico y amoniacó.

La prueba de indol se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Éste es el producto químico activo de los reactivos de Kovac y de Ehrlich.

Fundamento Christensen

Ureasa

La urea es una diamida del ácido carbónico. Todas las amidas se hidrolizan fácilmente, con la liberación de amoniacó y dióxido de carbono. La ureasa es una enzima que tienen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar la urea. El amoniacó reacción en solución para formar carbonato de amonio, lo que produce alcalinización y aumento del pH del medio, por lo que hay vira a rosa.

Fundamento Citrato Simmons

Utilización de citrato

La única fuente de carbono de este medio es el citrato sódico, compuesto orgánico simple que se encuentra como uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs). Algunas bacterias pueden obtener energía mediante la fermentación de hidratos de carbono, con el citrato como única fuente de carbono. La utilización de sustrato se detecta en el medio por la producción de subproductos alcalinos. El medio contiene citrato de sodio como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar el citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con producción de amoníaco, lo que produce la alcalinización del medio por conversión a hidróxido de amonio.

Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.

Prats, G. (2006). *Microbiología clínica*. Ed. Médica Panamericana.

9.4 Tinción de Gram

Fundamento

La tinción de Gram diferencia las bacterias en dos variedades fundamentales de células. Se dice que las bacterias que conservan la tinción de cristal violeta inicial (púrpura) son Grampositivas, mientras que las que se decoloran y se tiñen de rojo con fucsina de carbol (o safranina) se dice que son Gramnegativas. Esta respuesta de tinción se basa en la composición química y estructural de las paredes celulares de ambas variedades de bacterias. Los Grampositivos tienen una pared gruesa y relativamente impermeable que resiste la decoloración y está compuesta de peptidoglicano y polímeros secundarios. Los Gramnegativos tienen una delgada capa de peptidoglicano más una bicapa lipídica superpuesta conocida como membrana externa, que puede romperse por la decoloración.

Procedimiento

1. Realizar un frote bacteriano

- 1 Tomar una pequeña cantidad bacteriana de una sola colonia aislada proveniente de un cultivo puro y colocarla en un portaobjetos con agua destilada.
- 2 Homogeneizar la muestra con el asa previamente usada.
- 3 Realizar un extendido de la mezcla con el asa en uso.
- 4 Dejar secar la muestra.
- 5 Fije el material al portaobjetos pasándolo tres o cuatro veces a través de la llama de un mechero de bunsen.

2 Realización de Tinción de Gram

- 1 Coloque el frote en un soporte para tinción y recubra la superficie con una solución de violeta de genciana durante un minuto y lave con agua destilada.

2 Cubra el frote con una solución yodada durante un minuto, nuevamente lavar con agua.

3 Impregne la superficie con unas gotas de alcohol-acetona por unos 10 segundos o menos dependiendo del grosor del frote y lave agua corriente.

4 Cubra la superficie con safranina durante un minuto. Lave agua corriente.

5 Coloque el frote en posición vertical en el soporte para tinción para permitir que el exceso de agua drene y el frote se seque.

3 Lectura

Examine el frote teñido con el objetivo de inmersión (100X) de un microscopio óptico en campo claro.

Interpretación

Las bacterias Grampositivas se tiñen de azul-morado, las Gramnegativas aparecen de color rosa-rojo.

Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.

9.5 Identificación bacteriana en Medio MacConkey

Morfología colonial

Organismos	Resultados del crecimiento
<i>E. coli</i>	Colonias de color de rosa a rojo (pueden estar rodeadas de una zona con precipitación de bilis)
<i>Enterobacter, Klebsiella</i>	Colonias mucoides de color rosa
<i>Proteus</i>	Colonias incoloras, inhibición de agrupamiento dinámico alrededor de colonias aisladas*
<i>Salmonella, Shigella</i>	Colonias incoloras. Color del medio: Anaranjado a ámbar
<i>Pseudomonas</i>	Colonias irregulares, de incoloras a color rosa

Fermentación de lactosa

1. Fundamento

El medio MacConkey contiene rojo neutro como indicador el cual se distingue de tono amarillo cuando el pH es neutro mientras que a pH ácido se aprecia de color rosa-rojo.

2 Interpretación

1 Bacterias capaces de metabolizar la lactosa como *E. coli* acidifican el medio (por la producción de ácidos mixtos) desarrollando colonias rosas-rojas.

2 Bacterias como *Salmonella sp* que no son capaces de fermentar la lactosa, dan como resultado colonias incoloras (tono del medio) o de apariencia amarilla.

Precipitación de sales biliares

Las bacterias productoras de ácidos fuertes, como *E. coli*, forman colonias rojo-rosa intenso con un precipitado rosado difuso en el agar que rodea las colonias causado por la precipitación de sales biliares en el medio, el cual ocurre con un pH bajo.

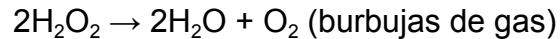
Foundations in Microbiology' 2007 Ed.(sixth Edition)2007 Edition

Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.

9.6 Prueba de catalasa

Fundamento

El H_2O_2 se forma como uno de los productos finales del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule resulta letal para las células bacterianas. La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y O_2 según la siguiente reacción:



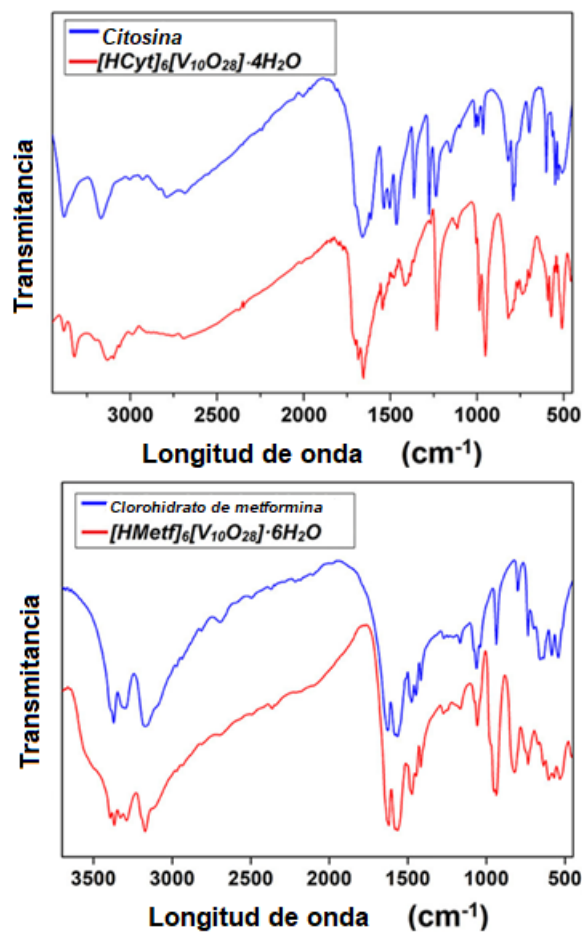
Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica, transferir parte del centro de una colonia en estudio a la superficie de un portaobjetos.
2. Añadir 10 μ L de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
3. Observar la formación de burbujas.

Interpretación

1. La aparición inmediata de efervescencia constituye una reacción positiva para catalasa.
2. La formación de unas pocas y pequeñas burbujas después de 20 o 30 segundos se considera una reacción negativa.

9.7 Espectros infrarrojo de MetfV₁₀ y CitV₁₀.



Espectro IR, CitV₁₀ y MetfV₁₀. (Tomada de Sánchez-Lara *et al.*)

Sánchez-Lara, E., Treviño, S., Sánchez Gaytán, B. L., Sánchez-Mora, E., Castro, M. E., Meléndez-Bustamante, F. J., & González-Vergara, E. (2018). Decavanadate Salts of Cytosine and

Metformin: A Combined Experimental-Theoretical Study of Potential Metallodrugs Against Diabetes and Cancer. *Frontiers in chemistry*, 6, 402.

9.8 Criterios de calidad para la determinación de CMI en *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213/ Criterios de sensibilidad y resistencia en *Enterobacterias*, *Staphylococcus sp.* y *Enterococcus sp.*

CEPA	Ampicilina µg/mL	Ceftriaxona µg/mL	Amikacina µg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2 – 8	0.03 – 0.12	0.5 – 4
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.5 – 2	1.0 – 8.0	1.0 – 4.0

Criterios de calidad para la determinación de CMI (µg/ml) en *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213. (Valores tomados de las guías CLSI, M-100, Tabla 5A).

Microorganismo	Ampicilina µg/mL			Ceftriaxona µg/mL			Amikacina µg/mL		
	S	SI	R	S	SI	R	S	SI	R
<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 8	1 6	≥ 32	≤ 1	2	≥ 4	≤ 16	32	≥ 64
<i>Staphylococcus sp.</i>	≤ 0.12	–	≥ 0.25	–	–	–	≤ 16	32	≥ 64
<i>Enterococcus sp.</i>	≤ 8	–	≥ 16	–	–	–	–	–	–

Criterios para determinar sensibilidad y resistencia por CMI ((µg/ml). – (Sin datos de referencia), S (sensible), SI (sensibilidad intermedia), R (resistente). (Valores tomados de las guías CLSI, M-100, Tabla 2A, 2C y 2D).

Wayne, P. A. (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. *CLSI document M100-S20*

9.9 Concentraciones de antibióticos en µg/ml y su equivalencia en µM.

Concentraciones de Antibióticos			
µg/ml	µM		
	Ampicilina	Ceftriaxona	Amikacina
0.1	0.1	0.11	0.1
0.2	0.2	0.22	0.2
0.5	0.4	0.45	0.4
1	0.7	0.9	0.8
2	1.4	1.8	1.7
4	2.9	3.6	3.4
8	5.8	7.2	6.8
16	11.5	14.4	13.7
32	22.9	28.8	27.4
64	45.8	57.6	54.7
128	91.5	115.2	109.4
256	183	230.4	218.9