



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN
CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DE CATÉTERES DE
PACIENTES HOSPITALIZADOS
(Modalidad: Tesis de Grado)

RITA BEATRIZ LOERO ACUÑA

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

Cumaná, febrero de 2013

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN
CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DE CATÉTERES DE
PACIENTES HOSPITALIZADOS

APROBADO POR:



Prof. Yasmina Araque C.
Asesora





ÍNDICE

DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTO	6
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
METODOLOGÍA	17
Aislados bacterianos	17
Transporte de aislados	17
Reactivación de los aislados	17
Diagnóstico bacteriológico de los aislados sugestivos del género <i>Pseudomonas</i>	17
Selección de las colonias de interés	17
Observación microscópica	18
Pruebas bioquímicas	18
Oxidasa	18
Fermentación de azúcares	18
Motilidad	18
Oxidación de azúcares (glucosa, maltosa, sacarosa, manitol)	19
Descarboxilación de la lisina	19
Hidrólisis de la arginina	19
Licuefacción de la gelatina	19
Crecimiento a 42°C	20
Diagnóstico bacteriológico para enterobacterias	20
Determinación de la presencia de exopolisacáridos para la formación de biopelículas a través del método del agar rojo congo	20
Determinación de la adherencia y formación de biopelículas a través del método de	

cristal violeta en tubo o macrométodo en tubo _____	21
Prueba de susceptibilidad antimicrobiana _____	21
Análisis estadístico _____	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	23
CONCLUSIONES _____	34
BIBLIOGRAFÍA _____	35
HOJA DE METADATOS _____	42

DEDICATORIA

A

Mi Dios, por darme paciencia y fortaleza para superar todos los momentos difíciles y por guiarme hacia el logro de esta gran meta.

Mis madres, Mirtha y Carmen Acuña, por siempre estar conmigo cada vez que las necesito, este esfuerzo es por ustedes y para ustedes.

Mi hija Sofía, espero servirle como inspiración y ejemplo a seguir para alcanzar sus sueños y metas, y no dejarse vencer ante las dificultades que en la vida se le presenten, lucha por lo que desees.

Mi esposo Lorenzo, por brindarme su amor y apoyo incondicional en todo momento. Tu fortaleza, constancia y perseverancia me sirvieron de ejemplo para alcanzar esta meta.

Mis hermanos, Ysabel, Jhonny, Rogelio, Fabiola y Fiorelly Loero, a pesar de la distancia, siempre estamos unidos, este logro es también de ustedes.

Mis amigos, Karol Bottaro, Marielys González, Carmen Carpio, Olymar Marchán, Jesús Rodríguez, Saray Ortiz, Antonieta Hernández, Candy Patiño y Dairene Moreno, esta vida no sería igual sin ustedes.

AGRADECIMIENTO

A

Mi asesora, la Dra. Yasmina Araque, por su asesoramiento y orientación en la elaboración de mi tesis.

Mis amigas Carmen Carpio, Marielys González y Karol Bottaro por asistirme incontables veces con su valiosa orientación, quienes con sus conocimientos y buenos consejos aportaron un granito de arena durante el desarrollo de mi trabajo de grado.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron para que este sueño se hiciera realidad.

Mil gracias

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Aislados de BGN provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011. _____ 23
- Tabla 2.** Porcentajes de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011. _____ 24
- Tabla 3.** Comparación en la formación de biopelículas (método en tubo) con la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011. _____ 31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología típica de las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* por el método del agar rojo congo provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011. A): colonias blancas (formadoras exopolisacárido), B): colonias rojas (no formadoras de exopolisacárido). _____ 28

Figura 2. Producción de biopelículas a través del método en tubo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011. El tamaño de los anillos formados por estas cepas fue designado a través de cruces (leve +, ++, moderada +++ y abundante ++++), (-): bacterias no formadoras de biopelícula, (+): bacteria formadora de biopelícula. _____ 30

RESUMEN

Se determinó la producción de biopelículas y la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras provenientes de catéteres de pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, en Cumaná, estado Sucre. Inicialmente, se identificaron los aislados bacterianos mediante el empleo de métodos microbiológicos convencionales para bacilos gramnegativos no fermentadores. La producción de biopelículas se estudió a través de los métodos cualitativos agar rojo congo y el método en tubo con cristal violeta. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión de disco en agar. Las cepas de *P. aeruginosa* mostraron resistencia a ceftazidima (60,71%), a meropenem (53,57%), a piperacilina (50,00%), a piperacilina/tazobactam (46,42%) y menor resistencia a gentamicina (39,28%), a ciprofloxacina (35,71%), a aztreonam e imipenem (32,14%). A través del método en tubo se evidenció que el 71,43% de las cepas fueron productoras de biopelículas mientras que por el método del agar rojo congo el 82,14% de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de cultivo de catéter produjeron exopolisacáridos. Al comparar la formación de biopelículas (método en tubo) con la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas se evidenció que tanto las cepas resistentes como sensibles pueden formar biopelículas.

INTRODUCCIÓN

En los últimos veinte años, se ha incrementado la percepción de que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en forma unicelular o libre, como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría se encuentran principalmente formando parte de depósitos biológicos denominados biopelículas (Fuster, 2004).

Las biopelículas (del inglés biofilm) son comunidades complejas de microorganismos y polímeros extracelulares, fijos a una superficie, formadas por una única especie o una variedad de especies diferentes (Costerton, 1995). Se pueden encontrar biopelículas en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Sólo necesitan un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, debido a que pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas (Miller y Ahearn, 1987). Las biopelículas poseen múltiples características, que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen; una de estas características es la heterogenicidad, lo que las hace organizaciones únicas que pueden estar conformadas por bacterias, hongos y protozoos (Costerton *et al.*, 1987; Flemming, 1999; Branda *et al.*, 2005).

Existen evidencias que las bacterias involucradas en infecciones relacionadas con cirugía e implantes se encuentran inmersas en una matriz de exopolisacáridos, denominadas biopelículas, que se extiende desde el sitio de implantación del biomaterial formando comunidades bacterianas (Mah y O'Toole, 2001). Las superficies de los biomateriales y las partículas debridadas aumentan la susceptibilidad a la infección, activan las defensas del hospedero y estimulan la liberación de mediadores inflamatorios, citoquinas, radicales oxígeno y enzimas lisosomales, resultando en daño proteico tisular e inflamación crónica, lo cual puede ser posteriormente agravado por actividades bacterianas y toxinas (Gristina, 1994).

Aunque la composición de la biopelícula es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario de la misma es el agua, que puede representar hasta el 97,00% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos secretados por las propias células que forman parte del mismo (Sutherland, 2001). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y diversos productos, procedentes de lisis de las bacterias (Branda *et al.*, 2005).

Estudios realizados, utilizando microscopía confocal, han mostrado que la arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno por toda su superficie, incluyendo aquellas ubicadas en las zonas más profundas. El estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro de la matriz dificulta su estudio, debido a que la existencia de estos canales facilita que en ellos se puedan encontrar ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno sea diferente, por lo cual, las bacterias que se encuentran en los estratos más superficiales aprovecharán más los nutrientes y otros metabolitos que las ubicadas en lo más profundo (Costerton *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1998; O'Toole, 2001; Stoodley *et al.*, 2002).

La hidrodinámica juega un papel importante en el desarrollo de la biopelícula, debido a que estas organizaciones se desarrollan en una interfase líquido-sólido donde la velocidad del flujo que lo atraviesa influye en el desprendimiento físico de los microorganismos, por esta razón la biología de la biopelícula se centra en su dinámico ciclo vital, donde la adhesión irreversible de la bacteria a la superficie promueve una unión activa mediante fimbrias, flagelos o pilis (Donlan y Costerton, 2002). Mediante microscopía electrónica se ha descrito que los flagelos y las fimbrias de tipo I, IV son importantes para la etapa de adherencia primaria en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* (O'Toole, 2000).

La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso, no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biopelículas; en este caso se ha descrito la participación de proteínas de superficie (Lasa *et al.*, 2006).

Durante la segunda fase o de crecimiento, la bacteria, una vez adherida, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia, similar al proceso de formación de colonias en placas de agar. A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, las bacterias comienzan a elaborar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula y éste comienza a desplegarse en una formación tridimensional, generando estructuras similares a setas (Ramadan, 2006).

Una vez que la biopelícula ha alcanzado la madurez, algunas células, ya sea aisladamente o en conglomerados bacterianos, se liberan para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de la biopelícula. El desprendimiento de estas células o conglomerados bacterianos puede ser resultado de fuerzas externas o de procesos activos inducidos por la biopelícula (Post *et al.*, 2004). La forma en que se produce el desprendimiento, afectaría, aparentemente las características fenotípicas de las bacterias, los conglomerados desprendidos desde la biopelícula conservarán, probablemente, ciertas características de éste, tales como la resistencia antimicrobiana. En cambio, las células bacterianas liberadas aisladamente podrían rápidamente volver a su fenotipo planctónico, tornándose nuevamente susceptibles a las defensas del hospedero y a los antimicrobianos (Donlan, 2001).

La capacidad de formar biopelícula no parece restringirse a un grupo específico de microorganismos, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa mayoría de las bacterias, independiente de la especie, puede existir dentro de la biopelícula adheridas a superficies en una interfase sólido/líquida, incluyendo

organismos importantes, tales como *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella* sp. y *Staphylococcus aureus* (Chole y Faddis, 2003). Esta adhesión a una superficie húmeda, ya sea inerte o viviente, es de carácter irreversible, es decir, la biopelícula no logra ser removida mediante lavado suave (Costerton *et al.*, 2001; Post *et al.*, 2004).

Davies *et al.* (1998) demostraron que, en la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* están implicados dos sistemas de señalización diferentes célula a célula: lasR-last y rhlR-rhl. Una vez conseguida una densidad suficiente de población, estas señales alcanzarán las concentraciones requeridas para activar los genes implicados en la diferenciación de la biopelícula. Mutantes incapaces de elaborar ambas señales producen biopelícula notoriamente más delgadas y sin su arquitectura típica. Además, pueden ser removidas mucho más fácilmente de superficies mediante uso de surfactantes.

Un avance importante en la comprensión de las biopelículas, ocurrió a comienzo de los años noventa con el descubrimiento de proteínas responsables del mecanismo de auto-inducción (del inglés; quórum sensing) (Gristina, 1994). El proceso quórum sensing funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal, de manera tal que, mientras más bacterias se unen, se incrementa la concentración local de esta señal. Una vez logrado ésto, se activan diferentes mecanismos en la bacteria, para finalmente lograrse la diferenciación de la biopelícula. El objetivo del quórum sensing es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. A menos que, esté presente un número adecuado de células bacterianas en la vecindad, los costos de producción de una biopelícula para una bacteria individual superan los beneficios (Singh *et al.*, 2000; Post *et al.*, 2004; Sanclement *et al.*, 2005; Ramadan, 2006).

Las bacterias que desarrollan quórum sensing elaboran y secretan moléculas señalizadoras, llamadas autoinductoras. Las principales moléculas empleadas para comunicarse con las demás bacterias son las acil-homoserina-lactonas, que predominan

en bacterias Gram negativas, mientras que oligopéptidos modificados prevalecen en bacterias Gram positivas. Las bacterias también poseen un receptor que puede detectar, específicamente, el auto-inductor respectivo. Cuando éste se une al receptor, activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos para la síntesis del inductor (Colón y Membrillo, 2004).

Debido a su presencia abrumadora, las biopelículas han sido reconocidas progresivamente como factores importantes en la patogenia de muchas infecciones humanas persistentes, incluyendo placa dental, caries, infecciones periodontales, neumonía por *Pseudomonas*, en fibrosis quística, cistitis crónica, endocarditis bacteriana, osteomielitis y prostatitis crónica; también se ha demostrado que, una variedad de dispositivos médicos implantables pueden portar bacterias formadoras de biopelículas, provocando infecciones asociadas tales como: sepsis por catéteres endovenosos y arteriales, en catéteres urinarios, sigmoidoscopios y lentes de contactos (Nazar, 2007).

La contaminación en los medios hospitalarios por bacterias u organismos formadores de biopelículas, se encuentra asociada a una serie de factores comunes como: colonización de sustratos por bacterias adhesivas, presencia de un biomaterial, tejido dañado o sustrato de tejido relativamente acelular. La iniciación de la infección por pequeños inóculos bacterianos, es causada con mucha frecuencia por *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*, provocando resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero, inflamación, necrosis, alteración de la respuesta mediada por células y posiblemente humoral del hospedero por la presencia del biomaterial y bacterias (Donlan, 2001).

P. aeruginosa pertenece al grupo de los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) aerobios, no esporulados, que degradan los hidratos de carbonos por vía oxidativa y no fermentativa (Koneman *et al.*, 2008). Las bacterias de este género, se comportan básicamente como patógenos intrahospitalarios y

oportunistas, capaces de resistir a la acción de un gran número de antimicrobianos, situación que ha conllevado a importantes repercusiones clínicas y terapéuticas (Gómez *et al.*, 2003).

Las áreas más frecuentes de infecciones intrahospitalarias son las unidades quirúrgicas, de cuidados intensivos o de quemados (Costerton *et al.*, 1994). La mayoría de estos pacientes que se encuentran hospitalizados, se les tiene que someter a una serie de procesos agresivos como la colocación de catéteres o de sondas, facilitando así vías de entrada para todo tipo de bacterias, las cuales, encuentran un campo de acción fácil para una infección oportunista, debido a que el enfermo se encuentra en estado de inmunosupresión (Stewart y Costerton, 2001).

Los catéteres intravasculares son dispositivos plásticos que permiten acceder al comportamiento intravascular a nivel central, éstos varían en su diseño y estructura, según se utilicen en forma temporal (días) o permanentes (semanas o meses) así como también en el material de fabricación, en el número de lúmenes y en el motivo por el cual se instalan (Stickler *et al.*, 1993).

El uso de los catéteres ha sido de gran utilidad clínica en la administración de medicamentos, fluidos y nutrición parenteral proporcionándole un acceso rápido y seguro al torrente sanguíneo, además, facilitan la monitorización venosa central o pulmonar en pacientes críticos, más, no están exentos de riesgos, describiéndose complicaciones mecánicas e infecciones asociadas a su uso (Becerra, 1993). Sin embargo, la infección relacionada a catéteres centrales constituye una de las principales complicaciones de su uso y la principal causa de bacteriemias intrahospitalarias primarias. En Venezuela, la incidencia de bacteriemia atribuible al uso de catéteres, es variable entre distintos centros hospitalarios y se aproxima a 4 o 5 eventos por 1 000 días de caracterización (Fica, 2003).

El proceso de contaminación del catéter puede ocurrir básicamente por tres vías: por

contaminación desde el punto de vista de inserción del catéter en la piel, siendo la fuente de infección más frecuente, cuando son colocados en un periodo inferior a 10 días, seguido de la contaminación de la luz del catéter, desde la conexión con el sistema de administración de fluidos, este mecanismo es más frecuente en catéteres de larga duración mayor de diez días, debido a la manipulación del personal sanitario y por último, la contaminación del líquido perfundido, la cual constituye otra fuente de infección menos frecuente, pero suele estar asociada con brotes epidémicos intrahospitalarios (León y Ariza, 2004; Barreto, 2007).

Se han desarrollado varias técnicas para identificar la formación de biopelículas por parte de las bacterias productoras de este material en dispositivos médicos (catéteres, sondas, entre otros) : una de esta técnica muy difundida por su sencillez y bajo costo, es la siembra de la colonia sospechosa en agar rojo congo (O’Gara y Humphereys, 2001); otra manera de determinar la presencia o no de biopelículas, es el método de fotodensimetría en cultivo de caldo teñido con safranina, el cual, tiene la ventaja de ser más exacto al proporcionar un valor cuantitativo, sin embargo, es más costoso y laborioso en su realización (Pascual, 2002); también se ha empleado la técnica del micrométodo en placa de microtitulación y el macrométodo en tubo, siendo ésta última la más utilizada debido a su bajo costo, rapidez y fácil interpretación de sus resultados, además de asociar la formación de biopelículas con la adherencia bacteriana (Máttar *et al.*, 2006).

Actualmente, en Venezuela existen escasos reportes sobre el estudio de biopelículas contaminantes de catéter, por lo que el presente trabajo tuvo como finalidad detectar la producción de biopelículas y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *P. aeruginosa*, provenientes de catéteres de pacientes hospitalizados, para ubicar estrategias que permitan aplicar medidas preventivas o profilácticas en el uso de los mismos, con el propósito de controlar la propagación de estas infecciones.

METODOLOGÍA

Aislados bacterianos

Entre los meses octubre 2010 - enero 2011 se obtuvieron 50 aislados de bacilos Gram negativos (BGN), provenientes de cultivos de catéteres utilizados por pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA) con diagnóstico de bacteriemia; previo consentimiento por parte de los pacientes según los lineamientos del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT).

Transporte de aislados

Los aislados fueron trasladados en agar conservación para permitir su viabilidad hasta su procesamiento, al laboratorio de bacteriología clínica del Departamento de Bioanálisis, UDO- Sucre.

Reactivación de los aislados

Con el propósito de determinar la viabilidad de los aislados, a partir del medio de conservación, éstos se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB) a 37°C, durante 24 horas; posteriormente, se sembraron en agar Mac Conkey (AMC) con la finalidad de verificar su pureza y observar las características macroscópicas de las colonias, así como la fermentación o no de la lactosa y la producción o no de pigmentos por parte de las colonias sugestivas del género *Pseudomonas*.

Diagnóstico bacteriológico de los aislados sugestivos del género *Pseudomonas*

El estudio bacteriológico, e identificación bioquímica de los aislados recolectados sugestivos del género *Pseudomonas*, se llevó a cabo siguiendo los métodos descritos para BGNF, (Castillo, 2001; Koneman *et al.*, 2008).

Selección de las colonias de interés

A partir del crecimiento bacteriano en los medios empleados, se procedió a verificar

las características morfológicas de las colonias, tales como tamaño, aspecto, olor, consistencia, forma y producción de pigmentos, así como la fermentación o no de la lactosa en el agar MacConkey y seleccionando las colonias lactosa negativa típicas con producción o no de pigmento, las cuales permitieron orientar sobre el grupo de bacterias en estudio.

Observación microscópica

A partir de las colonias seleccionadas en agar nutritivo, se realizó un frotis, aplicando la coloración de Gram (Hucker y Coon, 1923), para la identificación morfológica y tintorial del microorganismo de interés.

Pruebas bioquímicas

Oxidasa

Esta prueba permite detectar la presencia de la enzima citocromo oxidasa, y consistió en colocar una colonia, procedente de agar nutritivo, en una tira de papel impregnado con el reactivo tetrametil parafenilendiamina; una reacción positiva se manifestó por la aparición de un color púrpura en unos 30 segundos y la ausencia de color indicó una reacción negativa.

Fermentación de azúcares

A partir del agar MacConkey, se tomó un inóculo de las colonias y se procedió a sembrar por la técnica de punción y estrías en el agar hierro triple azúcar (TSI). El TSI es un medio nutritivo y diferencial que permitió estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de la glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la detección de la producción de ácido sulfhídrico (H₂S). Esta prueba se incubó 37°C por 24 - 96 horas en aerobiosis.

Motilidad

Se realizó mediante la siembra por punción en agar motilidad. Esta prueba determina la capacidad móvil por parte de los microorganismos. La lectura inicial se realizó a las 24

horas. La positividad de la prueba se evidenció mediante la presencia de turbidez y la negatividad de la prueba (sin motilidad) por la ausencia de turbidez alrededor de la punción, manteniéndose el medio claro alrededor.

Oxidación de azúcares (glucosa, maltosa, sacarosa, manitol)

La oxidación de los azúcares glucosa, manitol, maltosa y sacarosa se evidenció mediante la inoculación, por duplicado, en tubos que contenían medio basal oxidación - fermentación (O/F), con 1% de carbohidratos, de los cuales uno se selló con parafina líquida estéril. Los tubos se incubaron a 32°C por 24 a 96 horas. Las reacciones oxidativas se evidenciaron por un cambio del indicador de verde a amarillo debido a la presencia de ácido, en la parte superior del medio inoculado.

Descarboxilación de la lisina

Esta prueba permite medir la capacidad enzimática de las bacterias para descarboxilar un aminoácido y formar como producto final una amina. Se inoculó el medio con el microorganismo a estudiar, y los tubos fueron sellados con parafina líquida para proporcionar un ambiente anaeróbico y se incubaron a 32°C por 24 a 96 horas. La positividad de la prueba se evidenció al observarse el color púrpura en el medio y la negatividad, por la observación de un color amarillo.

Hidrólisis de la arginina

Se utilizó, para demostrar si las bacterias en estudio son capaces de hidrolizar el aminoácido arginina; el medio se inoculó con el microorganismo de interés. Luego se incubaron hasta por 4 días a 37°C, se realizaron lecturas diarias. La positividad de la prueba se evidenció al observarse un color púrpura en el medio y la negatividad por la observación de un color amarillo.

Licuefacción de la gelatina

Esta prueba se basa en determinar la producción de la enzima gelatinasa por parte de la bacteria, la cual hidroliza la gelatina y forma un precipitado. Consistió en inocular el

medio gelatina con suspensión bacteriana de la cepa a estudiar con un asa bacteriológica, formando una línea en la superficie del medio, para incubar luego las placas a 37°C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis. La positividad de la prueba se evidenció al observarse un precipitado alrededor del crecimiento de la colonia en el medio gelatina.

Crecimiento a 42°C

Constituye una prueba diferencial entre las especies del grupo fluorescente, donde se verifica la capacidad de las bacterias de crecer a altas temperaturas. Ésta se realizó por medio de la siembra de las cepas de interés en agar MacConkey y posteriormente, se incubaron en una estufa a 42°C durante 24 horas.

Diagnóstico bacteriológico para enterobacterias

El género y la especie se confirmaron mediante el protocolo de identificación convencional para enterobacterias (Koneman *et al.*, 2008), incluyendo las siguientes pruebas bioquímicas: oxidasa, fermentación de azúcares (medio Kligler), utilización del citrato (medio citrato de Simmon), producción de la enzima ureasa (agua peptonada), vía de fermentación de la glucosa (caldo rojo de metilo-Voges Proskauer), motilidad, producción de indol, descarboxilación de la ornitina (agar MIO) y descarboxilación de la lisina (caldo lisina).

Determinación de la presencia de exopolisacáridos para la formación de biopelículas a través del método del agar rojo congo

Una vez identificada la especie bacteriana, se procedió a preparar una suspensión bacteriana y se sembró en placas de agar nutritivo con 0,025% del indicador rojo congo, el cual induce una morfología colonial característica de las cepas según produzcan o no exopolisacáridos, las placas se incubaron a 37°C por 18 horas (Bravo *et al.*, 2005).

El resultado positivo es indicado por colonias blancas y lisas, y un resultado negativo es indicado por colonias rojas. Para este ensayo se utilizó una cepa certificada de

Pseudomonas aeruginosa (PAO 1) como control positivo.

Determinación de la adherencia y formación de biopelículas a través del método de cristal violeta en tubo o macrométodo en tubo

Se colocó 2 ml de medio infusión cerebro-corazón en un tubo de ensayo de vidrio, inoculado con la suspensión bacteriana a estudiar; se incubó por 24 horas a 37°C, luego, se procedió a eliminar el contenido del tubo y se colocaron 2 ml de cristal violeta al 1,00%; el tubo se rotó cuidadosamente durante 3 minutos a temperatura ambiente para asegurar una tinción uniforme del material adherido a las paredes; posteriormente, se eliminó el contenido y se lavó el tubo con agua destilada dos veces; finalmente, los tubos se dejaron secar. La prueba se consideró positiva cuando se observó la formación de un anillo en la parte superior de la fase líquida del cultivo en estudio, la cual se señala en forma cualitativa a través de cruces (leve +, ++, moderada +++ y abundante +++) (Christensen *et al.*, 1982).

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Para la realización de la prueba de susceptibilidad se empleó el método de difusión en agar descrito por Bauer *et al.* (1966). Se siguieron los lineamientos establecidos por el Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos, del inglés, Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2011). El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: se inocularon de 4 a 5 colonias aisladas del microorganismo identificado en 4,5 ml de solución salina fisiológica al 0,85% hasta observar turbidez ajustándolo con un patrón 0,5 de la escala de MacFarland. Luego, se humedeció un hisopo de algodón estéril con la suspensión bacteriana y, se diseminó sobre la superficie de la placa de agar Mueller Hinton. Se dejó secar de 3 a 5 minutos y luego se procedió a colocar los discos de antibióticos de elección: ceftazimida (30 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina (100 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), aztreonam (30 µg), todos de la marca comercial OXOID. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas en aerobiosis, al cabo de este

tiempo se procedió a realizar la lectura de los halos de inhibición, midiéndolos con regla milimetrada. Esto permitió, dependiendo del tamaño clasificarlo en sensible (S), intermedio (I) y resistente (R), según las categorías establecidas internacionalmente por el CLSI.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados en tablas y/o gráficos de frecuencia. Los patrones de susceptibilidad antimicrobiana fueron expresaron en porcentajes de resistencia y sensibilidad. Para comparar la formación de biopelículas y los perfiles de resistencia se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal - Wallis (Sokal y Rohlf, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A nivel hospitalario *P. aeruginosa* se considera un patógeno emergente de gran importancia clínica, ya que es la causa de numerosas epidemias en hospitales de varios continentes y es el responsable, entre el 2,00% y 10,00%, de todas las infecciones ocasionadas por bacterias Gramnegativas en las unidades de cuidados intensivos (Salazar *et al.*, 2006).

En el presente estudio, de un total de 50 aislados provenientes de cultivo de catéter, utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA), se identificaron 22 aislados pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y 28 (56,00%) a *P. aeruginosa*. A nivel local, Ponce (2010) aisló 36 cepas de *P. aeruginosa* de las cuales 19 (52,77%) de ellas provenían de catéteres de pacientes.

Cabe resaltar, que los hemocultivos de los pacientes con bacteriemias positivo para *P. aeruginosa* coincidieron con los resultados obtenidos de los cultivos de catéter, lo cual indica que, posiblemente, el origen de la bacteriemia en, dichos pacientes se inicio en los catéteres contaminados lo que demuestra la capacidad de adherencia y posterior colonización de *P. aeruginosa* en implantes como catéteres intravenosos, arteriales, urinarios, sondas, favoreciendo el desarrollo de la biopelícula lo que dificulta la erradicación de la infección en los pacientes hospitalizados.

Tabla 1. Aislados de BGN provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011.

Microorganismo	Nº	Porcentajes
<i>P. aeruginosa</i>	28	56,00 %
<i>Enterobacterias</i>	22	44,00 %
Total	50	100,00%

N: número total de aislados ambientales, BGN: Bacilos Gram Negativos.

P. aeruginosa constituye uno de los patógenos oportunistas aislados con mayor

frecuencia en pacientes internados. El tratamiento de las infecciones graves causadas por este microorganismo suele ser difícil, ya que éste es naturalmente resistente a una gran variedad de antimicrobianos y, además, pueden adquirir mecanismos de resistencia a prácticamente la totalidad de los antimicrobianos disponibles para su tratamiento, de manera que las infecciones producidas por este microorganismo son cada vez más difíciles de tratar (Pagniez *et al.*, 2006).

De los 28 aislados de *P. aeruginosa* se pudo demostrar que el 60,71% de los mismos resultó resistente a ceftazidima, representando el mayor porcentaje de resistencia obtenido en dicho ensayo, 53,57% a meropenem, 50,00% a piperacilina, 46,43% a piperacilina/tazobactam, 39,28% a gentamicina y 35,71% a ciprofloxacina. Con respecto a los antimicrobianos aztreonam e imipenem 32,14% de las cepas fueron resistentes a los mismos (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011.

Antimicrobianos	S (%)	R (%)	N° Total (%)
Ciprofloxacina	18 (64,29)	10 (35,71)	28 (100,00)
Ceftazimida	11 (39,29)	17 (60,71)	28 (100,00)
Piperacilina	14 (50,00)	14 (50,00)	28 (100,00)
Aztreonam	19 (67,86)	9 (32,14)	28 (100,00)
Gentamicina	17 (60,71)	11 (39,29)	28 (100,00)
Meropenem	13 (46,43)	15 (53,57)	28 (100,00)
Imipenem	19 (67,86)	9 (32,14)	28 (100,00)
Piperacilina/tazobactam	15 (53,57)	13 (46,43)	28 (100,00)

N°: número de cepas, (%): porcentaje, S: susceptible, R: resistente.

P. aeruginosa se caracteriza por expresar una resistencia natural (intrínseca) a diversos antibióticos sin relación estructural, esto se debe principalmente a la escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de una betalactamasa cromosómica

inducible tipo AmpC y la expresión constitutiva de diversos sistemas de expulsión activa, la participación conjunta de éstos tres factores condiciona resistencia natural a penicilina, aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxima, ceftriaxona, cefalosporinas de tercera generación orales, cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfonamidas, trimetropim, tetraciclina, novobiocina y ácido nalidíxico (Lauretti *et al.*, 1999; Gibb, 2002).

Los agentes antimicrobianos ejercen una fuerte presión selectiva sobre las comunidades bacterianas que comparten un nicho particular, promoviendo la selección y acumulación de genes de resistencia, dando origen al fenómeno conocido como resistencia múltiple a los antibióticos, fenómeno que afecta a un gran número de especies bacterianas (Narváez *et al.*, 2005).

Las cefalosporinas, al igual que las penicilinas, pertenecen al grupo de antimicrobianos β -láctamicos que actúan rompiendo la pared celular bacteriana. La respuesta de las bacterias después de la exposición a estos agentes es compleja y varía con respecto al microorganismo y al antimicrobiano en particular (Pagniez, *et al.*; 2006).

La resistencia antimicrobiana mostrada por las cepas de *P. aeruginosa* al meropenem puede deberse a la presencia de mecanismos de resistencia como, la disminución de la permeabilidad del antimicrobiano a través de la membrana externa debido a la disminución en la expresión de las porinas y el aumento de la expulsión del antimicrobiano mediado por la activación de las bombas de expulsión activas las cuales son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria (Suárez *et al.*; 2006).

P. aeruginosa es un microorganismo que presenta resistencia a la mayoría de los antimicrobianos, es por ello que ha sido objeto de numerosas investigaciones. Jaramillo (1996), en un estudio realizado sobre resistencia bacteriana, en la unidad de cuidados intensivos del Hospital de Caldas Colombia, encontró un alto porcentaje de resistencia a

piperacilina y ceftazidima en cepas de *P. aeruginosa* provenientes de puntas de catéter; menor porcentaje de las cepas resultaron resistente a aztreonam, gentamicina, ciprofloxacina y imipenem; resultados que coinciden con el presente estudio. De igual manera, Pagniez *et al.* (2006) reportaron porcentajes de resistencia a meropenem similares a los obtenidos en el presente trabajo, en un Hospital Universitario de Buenos Aires, Argentina.

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es uno de los serios problemas en la terapia de las enfermedades infecciosas y en la práctica epidemiológica (Williams, 2000). Ninguna sustancia antimicrobiana actúa sin el riesgo futuro de que los microorganismos desarrollen resistencia frente a ella (Stuart y Levy, 1998). Las cepas de *P. aeruginosa* se aíslan con frecuencia en pacientes sometidos a tratamientos antimicrobianos prolongados, lo cual favorece la adaptación al antimicrobiano y el surgimiento de la multirresistencia bacteriana (Asboe *et al.*, 1998).

El uso continuo e indiscriminado de los antimicrobianos en los hospitales y la falta de control para su uso, por la población en general, ha llevado a la selección de microorganismos resistentes y, por consiguiente, a la desaparición de cepas sensibles, razón por la cual, las bacterias que normalmente residen en los hospitales presentan resistencia a diferentes tipos de antimicrobianos (Barrier, 2000; Casellas, 2001; Mata, 2002).

Al analizar los resultados de las pruebas de susceptibilidad, se encontró un alto porcentaje de cepas de *P. aeruginosa* que resultaron resistentes a la mayoría de los antimicrobianos, excepto para el monobactámico (aztreonam), carbapenem (imipenem) y aminoglucósido (gentamicina), que fueron efectivos contra la bacteria. En tanto, todos estos antimicrobianos citados pueden dejar de ser activos a través de mutaciones o de la adquisición de nuevos genes que lleven una resistencia adquirida (Gibb, 2002). Por otra parte, hay que tener en cuenta que los antimicrobianos que se emplean rutinariamente han sido seleccionados por su actividad frente a bacterias platónicas.

Los antibiogramas que se realizan rutinariamente, en los laboratorios de bacteriología están diseñados para medir la bacteria crecida de forma planctónica, frente al antimicrobiano, sin tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no ser extrapolables a esa misma bacteria cuando está creciendo en el interior de una biopelícula (Mah y O'Toole, 2001).

Un estudio realizado por Figueras (2012), obtuvo 26 cepas de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes recluidos en el (HUAPA), de las cuales 18 (69,23%) fueron productoras de exopolisacárido colonias rosadas, lisas y mucoides y 8 (30,77%) colonias rugosas, brillantes no mucoides no productoras del mismo; es importante mencionar que las cepas no fueron aisladas de cultivo de catéter, resultados que coinciden con el presente trabajo.

De las 28 cepas de *P. aeruginosa* evaluadas en el presente estudio, 23 mostraron una morfología lisa y de color blanco (figura 1-A), en agar rojo Congo lo que indica un incremento en la producción de exopolisacáridos debido a que las cepas no son capaces de absorber el colorante rojo Congo, ya que este, es de naturaleza aniónica y el exopolisacárido está cargado negativamente, generando una repulsión de las cargas e impidiendo que ocurra la absorción del colorante en las colonias productoras de exopolisacáridos (Chung *et al.*, 2003).

Además de la morfología antes descrita en el presente trabajo se observó que 8 (17,86%) de las cepas aisladas mostraron otro tipo de morfología en el agar rojo Congo (colonias rugosas) como se observa en la figura 1-B, las cuales no son productoras de alginato. Resultados que coinciden en un estudio realizado por Ponce (2010) quien evaluó la producción de exopolisacárido en cepas de *P. aeruginosa* obteniendo 19 (52,78%) cepas con morfología lisa y de color blanca y sólo 17 (47,22%) presentaron un fenotipo rugoso y de color rojo, las cuales no fueron productoras de exopolisacárido.

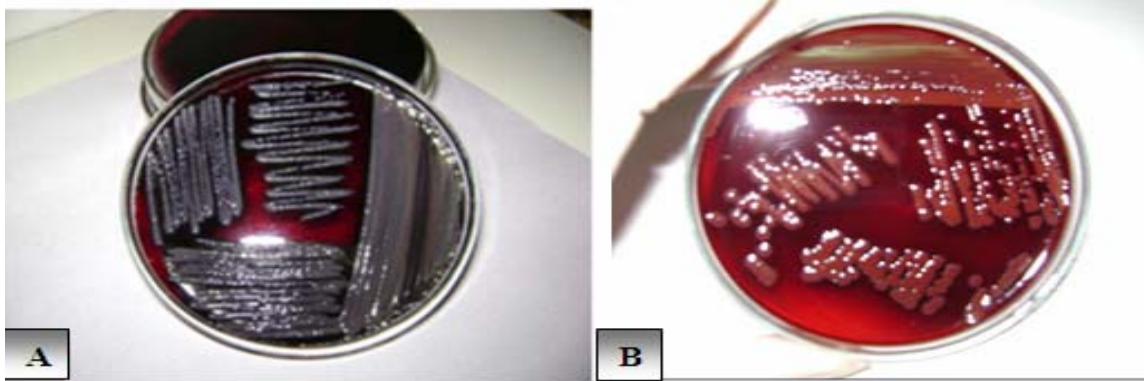


Figura 1. Morfología típica de las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* por el método del agar rojo congo provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011. A): colonias blancas (formadoras exopolisacárido), B): colonias rojas (no formadoras de exopolisacárido).

La siembra en agar rojo congo induce una morfología colonial característica de cepas, según produzcan o no exopolisacáridos y la producción de este compuesto es un importante marcador indirecto de la virulencia; en este caso, las cepas de mayor virulencia son precisamente las que no son capaces de absorber el colorante rojo congo, ya que la capa de exopolisacáridos que las recubre imposibilita este efecto y este compuesto es el que le confiere un alto grado de virulencia a *P. aeruginosa*, ya que esta bacteria tiene la capacidad de producir esta matriz, que es lo que interactúa con el medio externo. Además, permite el crecimiento de la bacteria tanto en tejidos vivos como inertes (Costerton *et al.*, 1999).

En el presente estudio, se obtuvieron colonias rugosas y rojas que no correspondieron a cepas productoras de alginato sino probablemente, a la presencia de otros componentes presentes en la matriz, la variación fenotípica de colonias rugosas en 17 (52,78%) cepas reportada en esta investigación (fenotipo B), probablemente se deba a diferencias genéticas entre las cepas de *P. aeruginosa*, señaladas por las investigaciones de Friedman y Kolter (2004). Ellos demuestran que además de alginato otros monosacáridos como manosa, galactosa y trazas de xilosa presentes en la matriz de *P. aeruginosa* no mucoides son codificados por los genes *psl* (*polysaccharide synthesis locus*) y están vinculados también con la formación de biopelículas *in vitro* por cepas

no mucoides de *P. aeruginosa*. Dichas variaciones pueden ser el resultado de la adaptación de la bacteria a condiciones adversas del medio ambiente para poder sobrevivir.

Las biopelículas representan una antigua estrategia de supervivencia procariótica (Lasa, 2006). Ésto debido a que, las bacterias logran ventajas significativas proporcionadas por las biopelículas, frente a fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH, al igual que concentrando nutrientes y facilitando la colonización de superficies y ambientes, favoreciendo de este modo la aparición de infecciones a nivel intrahospitalario.

La producción de biopelícula en cepas de *P. aeruginosa*, también fue evaluada por el método en tubo, obteniéndose en 20 (71,43%) de las 28 cepas, la formación de un anillo violeta en la parte superior de la fase líquida del cultivo en estudio, la cual se señala en forma cualitativa a través de cruces (leve +, ++, moderada +++ y abundante ++++), lo que representa la capacidad de la especie bacteriana de formar biopelículas en cantidades variables, indicando ésto una menor o mayor formación de biopelícula. Sólo 8 (28,57%) cepas no fueron capaces de formar los anillos, por lo que se consideraron no productoras de biopelículas (Figura 2).

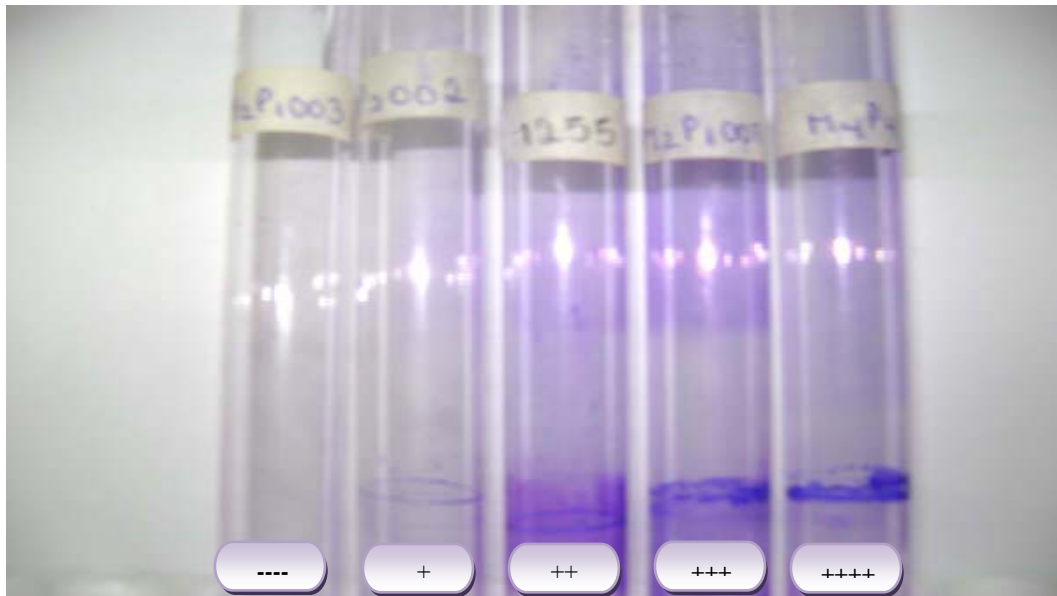


Figura 2. Producción de biopelículas a través del método en tubo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011. El tamaño de los anillos formados por estas cepas fue designado a través de cruces (leve +, ++, moderada +++ y abundante ++++), (-): bacterias no formadoras de biopelícula, (+): bacteria formadora de biopelícula.

La etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula es la adherencia sobre la superficie. En bacterias gramnegativas (*P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria O'Toole y Kolter (1998). La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial (Nazar, 2007), además la unión de las bacterias a una superficie ocurre más fácilmente, en aquellas que son hidrofóbicas como plástico y teflón, que en superficies hidrofílicas como vidrios y metales, las biopelículas están compuestas habitualmente por polímeros, cubren inevitable y rápidamente la superficie de cualquier material que se encuentra en contacto con un líquido y constituye un requisito indispensable para una ulterior adhesión bacteriana (Thomas y Nakaishi, 2006).

En el presente estudio, se encontraron altos porcentajes (71,43%) de cepas formadoras de biopelículas por el método en tubo con cristal violeta, lo que permitió corroborar la

asociación de dicha característica con la adherencia bacteriana. Un estudio realizado por Ponce (2010) demostró que de 36 cepas aisladas de *P. aeruginosa* 14 (38,88%) fueron no productoras de biopelículas y 22 (61,11%) productoras de la misma por el método en tubo, empleado en este trabajo de investigación.

En el presente estudio solo 8 (28,57%) cepas no fueron capaces de producir biopelícula, esto puede deberse a diversos factores que afectan el proceso de formación de la misma, como: la temperatura, el pH, la salinidad, concentración de oxígeno, el flujo de líquido, que es el principal factor que afecta tanto a las especies móviles como inmóviles, la hidrofobicidad, ya que la carga de la superficie también influye en la adhesión bacteriana, entre otros (Herrera, 2004).

Al comparar la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras provenientes de catéteres de pacientes hospitalizados en el HUAPA, con la susceptibilidad antimicrobiana (tabla 3), a través de la prueba no paramétrica Kruskal - Wallis, no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$), lo que indica que la producción de biopelículas se presenta en (71,43%) cepas de *P. aeruginosa*, independientemente de que las mismas fueran resistentes o no. Estos datos, sugieren que las cepas forman estos agregados celulares como mecanismos de protección contra las influencias exógenas dañinas presentes en este medio intrahospitalario y a la acción antimicrobiana.

Tabla 3. Comparación en la formación de biopelículas (método en tubo) con la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de cultivo de catéter utilizados por pacientes recluidos en el (HUAPA) durante octubre 2010 - enero 2011.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cepas Sensibles	Cepas Resistente	Nº total de cepas	Valor p
FB	8	12	20	0,0390*
NFB	4	4	8	0,0770*

$p > 0,05$ * No hay diferencias significativas, FB: Formadoras de biopelículas, NFB: No formadoras de biopelículas.

Donlan y Costerton (2002), sostienen que las bacterias que crecen en biopelículas son más resistentes a los agentes antimicrobianos que las que crecen en cultivos planctónicos, debido a su estructura física y a la conformación de multicapas, quizás por ésto, los tratamientos de las infecciones adquiridas en el hospital con los agentes antimicrobianos actuales resultan frecuentemente ineficaces. En el caso de *P. aeruginosa*, las infecciones están asociadas al uso de catéteres en unidades de cuidados intensivos, lo cual indica que la capacidad para adherirse y formar biopelículas es importante para la patogénesis de esta bacteria (Langstraat *et al.*, 2001).

El Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos publicó recientemente, que más del 60,00% de todas las infecciones microbianas son causadas por biopelículas, de igual manera se les atribuye el 60,00% de las infecciones intrahospitalarias; incrementando la estancia hospitalaria, los costos de atención y la morbilidad y mortalidad (Herrera, 2004).

Debido a que, la resistencia que presenta la bacteria dentro de la biopelícula depende de la agregación de bacterias en comunidades multicelulares, una estrategia para contrarrestarla, puede ser desarrollar terapias que rompan su estructura multicelular. Si se pierde la multicelularidad de la biopelícula, las defensas del hospedero pueden ser capaces de resolver la infección logrando de esta manera, restituir la eficacia de los antibióticos (Rivera y Méndez, 2005).

Se han realizado estudios que demuestran que las terapias potenciales incluyen enzimas que disuelvan los polímeros de la matriz, reacciones químicas que bloqueen la síntesis de la matriz y el empleo de análogos de proteínas y péptidos señalizadores, que interfieran con la comunicación célula a célula indispensable para la formación de una biopelícula, como es caso de una molécula denominada “furanona”, producida por el alga *Delisea pulcra*, con una estructura similar a las acilhomoserina lactonas. Estas moléculas en lugar de inducir la respuesta, bloquean el sistema de quórum sensing o

autoinducción y la consiguiente formación de la biopelícula como es en el caso de las bacterias gramnegativas donde su autoinductor es principalmente acilhomoserina lactona (Stewart y Costerton, 2001).

En la contaminación de catéteres venosos centrales, la superficie del catéter termina recubierta de proteínas del plasma, y otras proteínas de los tejidos como fibronectina, fibrinógeno, laminina. Estas proteínas favorecen la unión de las bacterias que posean adhesinas para las mismas. En el caso de las sondas urinarias, la fuente de contaminación puede ascender desde la bolsa recolectora y entrar en el lumen del catéter a través del exudado en el punto de entrada del catéter. En este caso, las bacterias se unen directamente sin que intervengan proteínas del paciente (Mattar *et al.*, 2006).

Las bacterias que conforman las biopelículas son las responsables de producir los síntomas de la enfermedad, todavía no están completamente establecidos, pero se ha sugerido que las bacterias de la biopelícula pueden producir endotoxinas, se pueden liberar grupos bacterianos al torrente sanguíneo, las bacterias pueden escapar a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune y por otro lado, las biopelículas constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antimicrobianos (Donlan, 2002).

CONCLUSIONES

Se aislaron cepas de *P. aeruginosa* de cultivo de catéteres de pacientes en el HUAPA provenientes de distintos servicios, las cuales fueron identificadas a través de métodos bioquímicos convencionales.

Las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de cultivo de catéteres de pacientes en el HUAPA fueron resistentes a la mayoría de los antimicrobianos empleados excepto aztreonam e imipenem.

Se demostró la producción de exopolisacárido en 23 cepas de *P. aeruginosa* a través del método del agar rojo congo y 20 cepas formaron biopelículas por el método en tubo con cristal violeta.

La resistencia antimicrobiana y la capacidad para formar biopelícula, fueron características independientes en las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

Asboe, G.; Gant, V.; Aucken, H.; Moore, D.; Umasankar, S. y Bingham, J. 1998. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* strains in respiratory infection in AIDS patients. *AIDS*, 12: 1771-1775.

Barreto, S. 2007. Formación de biopelículas en morfotipos variables de *Klebsiella pneumoniae* con complejos de multirresistencia. Resumen Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT).

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.

Barrier, S. 2000. Bacterial resistance to betalactams, and its prevention with combination antimicrobial therapy. *Pharmacotherapy*, 12(5): 397-402.

Becerra, C. 1993. Infecciones nosocomiales. Perfil epidemiológico. *Actually Infections*, 1: 25-27.

Branda, S.; Vik, S.; Friedman, L. y Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiology*, 13: 20-26.

Bravo, L.; Salazar, D.; Arce, M.; García, H.; Ramírez, M.; Cabrera, E.; Fernández, A. y Castañeda, N. 2005. Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas en animales domésticos y afectivos. *Revista Electrónica de Veterinaria REVET*, 6(11): 29-33.

Casellas, J. 2001. Resistencia bacteriana por producción β -lactamasa de espectro extendido: Perspectiva global y latinoamericana en el escenario hospitalario. Reunión de consenso. La aparición de microorganismos productores de ESBL en América Latina: Recomendaciones para su control y tratamiento (Sao Pablo, Brasil). *Clinical Infections Diseases*, 8: 12-16.

Castillo, E. 2001. Identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa. *Manual del Centro de Referencia Bacteriológica*. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo.

Chole, R. y Faddis, B. 2003. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: A possible mechanism to explain chronicity. *Archives of Otolaryngology Head Neck Surgery*, 129: 634-636.

Chung, J.; Altman, E. y Beveridge, T. 2003. Colonial morphology of *Burkholderia cepacia* complex genomovar III: implication in exopolisaccharide production, pilus expression, persistence in the mouse. *Infection and Immunity*, 71(2): 904-909.

Christensen, G.; Parísi, J.; Bisno, A.; Simpsom, W. 1982. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunology*, 37: 318-326.

involucrando seres humanos. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.

Colón, M. y Membrillo, H. 2004. Comunicación entre bacterias. <http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/Capitulo_04/Capitulo04.pdf>.

Costerton, J.; Cheng, K. y Geesy, G. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41: 435-464.

Costerton, J.; Lewandowski, Z.; DeBeer, D.; Caldwell, D.; Korber, D. y James, G. 1994. Biofilms the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176: 2173-2242.

Costerton, J. 1995. Overview of microbial biofilms. *Journal Industry Microbiology*, 15: 137-140.

Consterton, J.; Philip, S. y Greenberg, E. 1999. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322.

Costerton, J.; Stewart, P. y Greenberg, E. 2001. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322.

CIOMS. 2002. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Twenty-first Informational Supplement. Document M100-S21. Wayne, Pennsylvania, 31(1): 42-46.

Davies, D.; Parsek, M.; Pearson, J.; Iglewski, B.; Costerton, J. y Greenberg, E. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280: 295-298.

Donlan, R. 2001. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emergency Infection Diseases*, 8(9): 881-890.

Donlan, R. y Costerton, J. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review*, 15: 167-193.

Fica, A. 2003. Consenso nacional sobre infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales. *Revista Chilena de Infectología*, 20: 39-40.

Figueras, M. 2012. Efecto del tratamiento fotodinámico con azul de toluidina o en biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Tesis de Pregrado. Universidad de Oriente.

Friedman, L. y Kolter, R. 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology*, 186(7): 4457-4465.

Fuster, V. 2004. *Los biofilms en la industria alimentaria*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana.

Flemming, H. 1999. *Methods for investigation of biofilms*. Microbiology influenced corrosion of industrial materials – Biocorrosion network.

Gibb, A.; Tribuddharat, C. y Moore, R. 2002. Nosocomial outbreaks of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new blaIMP allele, blaIMP-7. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46: 255-258.

Gómez, C.; Leal, A.; Pérez, M. y Navarrete, M. 2003. “Mecanismo de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*; Entendiendo a un peligroso amigo”. “SCIELO”. <<http://www.revmed.unal.edu.co/revislafm>> (08/09/2006).

Gristina, A. 1994. Biofilms and chronic bacterial infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, 16: 171-178.

Herrera, M. 2004. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova*,

Bogotá, 2: 71-80.

Hucker, G. y Coon, H. 1923. Methods of Gram staining technical bulletin. *New York State Agriculture Experimentation*, 93: 11-37.

Jaramillo, L. 1996. Resistencia bacteriana a los antibióticos en la unidad de cuidados intensivos, Hospital de Caldas, 1992-1994. *Colombia Médica*, 27: 69-76.

Koneman, E.; Allens, S.; Dowell, V.; Janda, W. y Washington, W. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana.

Lasa, I.; Del Pozo, J.; Penadés, J. y Leiva, J. 2006. Biofilms bacterianos. <<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/>>.

Langstraat, J.; Bohse, M. y Clegg, S. 2001. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infection Immunology*, 69: 5805-5812.

Lauretti, L.; Riccio, M.; Mazzariol, A.; Cornaglia, G.; Amicosante, G. y Fontana, R. 1999. Cloning and characterization of blaVim, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1584-1590.

León, C. y Ariza, J. 2004. Guías para el tratamiento de las infecciones relacionadas con catéteres intravasculares de corta permanencia en adultos. *Revista de Infectología*, 22: 92-101.

Mah, T. y O'Toole, G. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiology*, 9: 34-39.

Mata, G. 2002. Frecuencia de cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infección intrahospitalaria en la unidad de cuidados intensivos del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de oriente, Cumaná, Venezuela.

Máttar, S.; Cuevas, M.; Aldana, O.; Sussman, O. y Arango, J. 2006. Estudio microbiológico de *Staphylococcus coagulasa* negativas productoras de biocapa mucoide (slime). *Infection Immunology*, 59: 445-449.

Miller, M. y Ahearn, D. 1987. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrophilic

contact 1^{er} substrata. *Journal Clinical Microbiology*, 25(8): 1392-1397.

Narváez, P.; Pedroza, R.; Alonso, G. y Rodríguez, V. 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1): 29-34.

Nazar, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Revista Otorrinolaringología Cirugía y Cuello*, 27: 61-72.

O’Gara, J. y Humphereys, H. 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *Journal Medical Microbiology*, 50: 582-587.

O’Toole, G. y Kolter, D. 1998. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28: 449-461.

O’Toole, G. 2000. Biofilm formation as microbial development, *Annual Review Microbiology*, 5: 49-79.

O’Toole, G. 2001. Mechanismos of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*, 9: 34-39.

Pagniez, G.; Radice, A.; Cuirolo, A.; Rodríguez, H.; Vay, C.; Famiglietti, A. y Gutkind, G. 2006. Prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*, 38: 33-37.

Pascual, A. 2002. Pathogenesis of catheter – related infections: lesson for new designs. *Clinical Microbiology Infections*, 8: 256-264.

Ponce, Y. 2010. Evaluación de métodos cualitativos y cuantitativos para la detección de biopelículas en aislados de *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas* sp. de muestras provenientes de centros hospitalarios. Tesis de Postgrado. Universidad de Oriente.

Post, J.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L. y Ehrlich, G. 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion Otolaryngology Head Neck Surgery*, 12:

185-190.

Ramadan, H. 2006. Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Current Opinion Otolaryngology Head Neck Surgery*, 14(3): 183-186.

Rivera, J. y Méndez, C. 2005. Biopelículas y salud pública. *Journal Medical Microbiology*, 50(4): 172-176.

Salazar, E.; Nieves, B.; Araque, M.; Velasco, E.; Ruiz, J. y Villa, J. 2006. Outbreak caused by *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27: 397-403.

Sanclement, J.; Webster, P.; Thomas, J. y Ramadan, H. 2005. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 115: 578-82.

Singh, P.; Schaeffer, A. y Parsek, M. 2000. Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407: 762-764.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1980. *Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. San Francisco, Estados Unidos.

Stewart, P. y Costerton, J. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 14: 135-138.

Stickler, D.; King, B. y Morris, L. 1993. Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. *Journal Infections*, 27: 133-135.

Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. y Costerton, J. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review Microbiology*, 56: 187-209.

Suárez, C.; Catan, J.; Guzman, A. y Villegas, M. 2006. Mecanismos de resistencia a carbapenemos en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Asociación Colombiana de Infectología*, 2: 10-16.

Sutherland, I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147: 3-9.

Thomas, J. y Nakaishi, L. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *Journal American Dentistry Association*, 137: 105-155.

Williams, R. 2000. Resistencia a los antimicrobianos: los hechos. Boletín de medicamentos esenciales. *Organización Mundial de la Salud*, 28.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Formación De Biopelículas Y Susceptibilidad Antimicrobiana En Cepas De Pseudomonas Aeruginosa Provenientes De Catéteres De Pacientes Hospitalizados
---------------	---

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Loero Acuña, Rita Beatriz	CVLAC	17.673.1276
	e-mail	garralori@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Pseudomonas aeruginosa
Biopelículas
Exopolisacárido

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se determinó la producción de biopelículas y la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras provenientes de catéteres de pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, en Cumaná, estado Sucre. Inicialmente, se identificaron los aislados bacterianos mediante el empleo de métodos microbiológicos convencionales para bacilos gramnegativos no fermentadores. La producción de biopelículas se estudió a través de los métodos cualitativos agar rojo congo y el método en tubo con cristal violeta. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión de disco en agar. Las cepas de *P. aeruginosa* mostraron resistencia a ceftazidima (60,71%), a meropenem (53,57%), a piperacilina (50,00%), a piperacilina/tazobactam (46,42%) y menor resistencia a gentamicina (39,28%), a ciprofloxacina (35,71%), a aztreonam e imipenem (32,14%). A través del método en tubo se evidenció que el 71,43% de las cepas fueron productoras de biopelículas mientras que por el método del agar rojo congo el 82,14% de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de cultivo de catéter produjeron exopolisacáridos. Al comparar la formación de biopelículas (método en tubo) con la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas se evidenció que tanto las cepas resistentes como sensibles pueden formar biopelículas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Araque, Yasmina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLA C	8000717
	e-mail	yamasi40@hotmail.com
	e-mail	
Ponce, Yusulbeth	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLA C	11829822
	e-mail	yusulbeth@yahoo.es
	e-mail	
Guzmán Militza	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLA C	8954225
	e-mail	militzaguz@yahoo.es
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año **Mes** **Día**

2012	11	12
------	----	----

Lenguaje: Spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-Loero.Doc	Application/word

Alcance:

Espacial: Nacional

Temporal: Temporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

[Handwritten Signature]
JUAN A. BOLANOS CUNPEL
Secretario

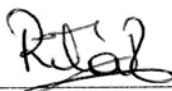


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

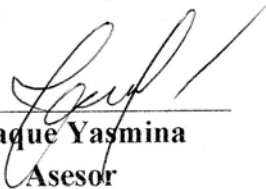
JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Loero Rita
Autor



Araque Yasmina
Asesor