



Universidad Central de
Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

**EVALUACIÓN DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA A CLORURO DE BARIO EN
AISLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* CAUSANTES DE INFECCIONES EN
EL TRACTO RESPIRATORIO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central
de Venezuela, por la bachiller Mónica Quijada
como requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutor: Prof. Giovanni Angiolillo

CARACAS, VENEZUELA

ABRIL – 2018

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) Br. MÓNICA QUIJADA**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Mónica Quijada, C.I: 23.635.673, titulado “**Evaluación del fenotipo de resistencia a cloruro de bario en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones en el tracto respiratorio**”, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veinte días del mes de abril del año dos mil dieciocho, dejando constar que el Prof. Giovanni Angiolillo Rodríguez actuó como coordinador del jurado examinador.



Prof. Fernandes Andreina



Prof. Pérez Indira



Prof. Giovanni
Angiolillo Rodríguez
(Tutor)

AGRADECIMIENTOS

Son demasiadas las personas que estuvieron conmigo a lo largo de toda la carrera, que me apoyaron o que de alguna manera se hicieron notar. Mi primer agradecimiento es para mis profesores, quienes me formaron para ser la profesional que a partir de ahora seré. A la profesora Guillermina por aceptarme en su laboratorio y por todos los consejos que me dio, académicos y personales, durante mi estadía en el LBP. Al profesor Giovanni por haber dedicado tiempo para ser mi tutor y para responder mis incesantes preguntas. A las profesoras Indira y Victoria por ser mis segundas tutoras, y a la profesora Beatriz por ser una guía cuando así lo necesité. A Marlui por ser mi compañera de laboratorio y una amiga muy especial. Todos hicieron de mi estadía en el LBP los mejores momentos del cierre de mi carrera. Topo hoy, topo siempre.

A mis amigos de la universidad que estuvieron durante mis altos y bajos y tuvieron que aguantarse a la Mónica feliz y a la Mónica amargada, su paciencia y amistad fue infinita y estoy muy agradecida por todos los momentos que compartimos y que seguiremos compartiendo como Licenciados. A mis mejores amigas, Nayesth y Astrid, por siempre estar cuando las he necesitado, no importa cuánto la vida nos separe, siempre estaremos unidas.

A mi familia, tíos, primos, abuelos, que siempre han creído en mi y en mis capacidades y que han estado pendiente de mis logros durante toda mi vida. Pero mi mayor agradecimiento es a mis padres, Belkis y Williams, quienes han sido mi mayor roca y mi guía en la vida, me han ayudado a seguir adelante incluso cuando yo misma he perdido la fe, y me han dado lo mejor que cualquier persona puede tener: amor y apoyo incondicional sobre todas las cosas. No importa lo que escriba o lo que haga, nunca será suficiente para demostrar cuan agradecida estoy de que sean mis padres.

Y por último, a mi casa de estudio, la casa que vence la sombra, la Universidad Central de Venezuela, donde aprendí las mejores lecciones de vida, hasta ahora, donde conocí personas maravillosas y adquirí los conocimientos que me ayudaron a llegar hasta este momento y que serán mi base por el resto de mi carrera. Porque solo un ucevista entiende que llegar lejos no es estar sobre las nubes, sino debajo de ellas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	2
Pseudomonas aeruginosa	2
Infecciones nosocomiales	3
Infecciones respiratorias	3
Clasificación de los antibióticos	5
Mecanismos de resistencia a antibióticos	7
Biopelículas	9
Ciclo vital de las biopelículas	10
Resistencia a antibióticos.....	13
Metales pesados	14
Resistencia a metales pesados	15
ANTECEDENTES	17
Estudios a nivel internacional.....	17
Estudios a nivel nacional	21
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Cepas bacterianas	25
Cultivo de las cepas bacterianas aisladas de muestras del HUC y de pacientes con infecciones respiratorias	27
Corroboración de especie de las muestras en estudio.....	27
Tinción Gram.....	27
Prueba catalasa	28
Prueba oxidasa.....	28
Agar Hierro Kligler	28

Prueba del citrato	28
Determinación de resistencia a antibióticos	29
Método de susceptibilidad por difusión de disco (Kirby-Bauer)	29
Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	30
Crecimiento de biopelícula en microplacas de poliestireno	31
Procesamiento de resultados.....	32
RESULTADOS	33
Corroboración de especie de las muestras en estudio, provenientes de muestras del HUC y pacientes con infecciones en el tracto respiratorio.....	33
Determinación de resistencia a antibióticos de las cepas provenientes de infecciones en el tracto respiratorio	34
Aproximación de la MIC	36
Clasificación de las cepas en estudios según la capacidad de formación de biopelículas en ausencia y presencia de BaCl ₂	37
DISCUSIÓN	48
Corroboración de especie de las muestras en estudio.....	48
Resistencia a diversos antibióticos	48
Efecto del BaCl ₂ sobre células en crecimiento libre	51
Efecto del BaCl ₂ sobre biopelículas.....	53
Biopelículas en interfase aire-líquido	55
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	59
ANEXO	60
BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Procedencia y nomenclatura de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> estudiadas y los controles utilizados.....	26
Tabla II. Concentración de antibiótico en discos para la técnica de Kirby-Bauer.....	30
Tabla III. Clasificación de las cepas, provenientes de muestras respiratorias, según su resistencia a los antibióticos estudiados (AMK, AMP, AMX, STR, IMP, KAN, MEM, TET).	35
Tabla IV. Perfiles de resistencia, de las cepas provenientes de infecciones respiratorias, a los antibióticos estudiados (AMK, AMP, AMX, STR, IMP, KAN, MEM, TET)..	35
Tabla V. Fenotipo de resistencia de cepas en estudio a BaCl ₂ mediante MIC.	37
Tabla VI. Parámetros para la clasificación de las cepas, según su formación de biopelícula, en ausencia de BaCl ₂	38
Tabla VII. Parámetros para la clasificación de las cepas, según su formación de biopelícula, en presencia de BaCl ₂ (50 mM).	40
Tabla VIII. Parámetros para la clasificación de las cepas, según su formación de biopelícula, en presencia de BaCl ₂ (100 mM).	42
Tabla IX. Parámetros para la clasificación de las cepas, según su formación de biopelícula, en presencia de BaCl ₂ (150 mM).	44
Tabla X. Clasificación de las cepas provenientes del HUC según su capacidad de formación de biopelículas a diversas concentraciones de BaCl ₂	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de resistencia de cepas en estudio a diversos antibióticos mediante el método de difusión. AMK: amikacina; AMP: ampicilina; AMX: amoxicilina; STR: estreptomicina; IMP: imipenem; KAN: kanamicina; MEM: meropenem; TET: tetraciclina.	36
Figura 2. DO de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en ausencia de BaCl ₂ (0 mM). DOM: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.	39
Figura 3. DO de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en presencia de BaCl ₂ (50 mM). DOM: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.	41
Figura 4. DO de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en presencia de BaCl ₂ (100 mM). DOM: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.	43
Figura 5. DO de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en presencia de BaCl ₂ (150 mM). DOM: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.	45
Figura 6. Variación de las DO de las cepas en estudio, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en ausencia y presencia de BaCl ₂ (50, 100, 150 mM). DOM: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

μL: micro litros	HUC: Hospital Universitario de Caracas
AMK: amikacina	IBE: Instituto de Biología Experimental
AMP: ampicilina	IMP: imipenem
AMX: amoxicilina	KAN: kanamicina
AN: agar nutritivo	LB: Luria Bertani
Ba: bario	LBP: Laboratorio de Plásmidos Bacterianos
BaCl₂: cloruro de bario	MEM: meropenem
BaSO₄: sulfato de bario	MIC: Concentración Mínima Inhibitoria
C: concentración	min: minuto(s)
CLSI: Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio	mM: mili molar
CSFM: Comité de Antibiogramas de la Sociedad Francesa de Microbiología	nm: nanómetro
CVCM: Centro Venezolano de Colección de Microorganismos	°C: grados centígrados
Desvest: desviación estándar	OMS: Organización Mundial de la Salud
DNA: ácido desoxirribonucleico	R: resistente
DO: densidad óptica	Redox: óxido reducción
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	s: segundo(s)
EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana	S: sensible
g: gramo(s)	STR: estreptomicina
h: hora(s)	UTI: Unidad de Terapia Intensiva
	V: volumen

RESUMEN

En la naturaleza, los microorganismos raramente son encontrados en crecimiento libre, son más propensos a existir en agregados, adheridos a superficies formando biopelículas. *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gramnegativo, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, capaz de formar biopelículas y es considerado uno de los principales patógenos nosocomiales; entendiéndose por infección nosocomial, aquellas infecciones contraídas por un paciente 72 h después del ingreso en el área clínica, que fue internado por una razón diferente. Las infecciones nosocomiales representan una gran problemática de salud pública, afectando la calidad de vida de quienes las contraen, empeorando la condición del paciente cuando son causadas por bacterias resistentes a los diversos antimicrobianos utilizados actualmente, como es el caso de *P. aeruginosa*. En la presente investigación se determinó el fenotipo de resistencia a BaCl_2 en aislados de *P. aeruginosa*, creciendo en biopelículas, provenientes de infecciones respiratorias, con el fin de presentar una alternativa para erradicar esta problemática que ataca al sistema de salud. Las cepas fueron gentilmente donadas, y previamente caracterizadas, por el Laboratorio AVILAB de la Clínica El Ávila. Para comparar el comportamiento de microorganismos de la misma especie, provenientes de diversos ambientes, fueron utilizadas cepas del HUC previamente caracterizadas en el Laboratorio de Biología de Plásmidos del Instituto de Biología Experimental; se realizó la corroboración de la especie de cada aislado mediante una batería de pruebas bioquímicas. Posteriormente, se llevó a cabo el método de susceptibilidad por difusión de disco (Kirby-Bauer), obteniendo que de los ocho antibióticos estudiados, solo los carbapenems fueron efectivos en el 80% de las cepas estudiadas, lo que resalta la problemática de resistencia a antibióticos por parte de *P. aeruginosa*. Para la selección de las concentraciones de BaCl_2 a utilizar para la determinación del fenotipo de resistencia, se realizó la técnica de MIC, obteniendo que a la mínima concentración estudiada (5 mM) los microorganismos, en fase exponencial, no son capaces de desarrollarse. En ausencia de BaCl_2 , las cepas fueron capaces de formar biopelículas en microplacas de poliestireno; al agregar BaCl_2 (50, 100, 150 mM), las biopelículas formadas fueron afectadas, en la mayoría de las cepas (69 %). Los resultados obtenidos permiten sugerir el uso del BaCl_2 en procesos de desinfección.

Palabras clave: Fenotipo, resistencia, cloruro de bario, antibióticos, biopelículas, *Pseudomonas aeruginosa*, infecciones respiratorias, concentración mínima inhibitoria.

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, los microorganismos raramente son encontrados en crecimiento libre, son más propensos a existir en agregados, adheridos a superficies formando biopelículas, las cuales se definen como un conjunto de microorganismos asociados a una superficie y envueltos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (Donlan, 2002; Fung y col., 2017). Cada biopelícula exhibe características fenotípicas que son diferentes a los microorganismos de vida libre, incluyendo un aumento en la resistencia a compuestos antimicrobianos, y en el caso de las bacterias patógenas, a las defensas del hospedador (Passerini y col., 2007). *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los principales patógenos nosocomiales asociado a enfermedades (fibrosis quística, endocarditis infecciosa) o a dispositivos (catéter intravenoso, prótesis valvular cardíaca, catéter peritoneal para diálisis, marcapaso cardíaco, tubo endotraqueal) (Hall-Stoodley y col., 2004).

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo gramnegativo, aerobio, con flagelo polar, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Prolifera en ambientes acuáticos y superficies de materia orgánica propicias en contacto con agua. Los lugares más comunes donde se ha aislado esta bacteria son: embalses, lagos, suelo, aguas residuales, heces y ambientes húmedos de uso común de los humanos como fregaderos, duchas, sistema de distribución de agua caliente y bañeras de hidromasajes (OMS, 2006).

P. aeruginosa es uno de los principales patógenos causante de infecciones intrahospitalarias a personas con algún factor predisponente. Coloniza principalmente tejidos del organismo que han sido dañados, por ejemplo, quemaduras, heridas

quirúrgicas, lesiones físicas en los ojos o personas con enfermedades del tracto respiratorio. Una vez invadido el hospedador, *P. aeruginosa* puede causar lesiones destructivas, septicemia y meningitis. Enfermedades como la fibrosis quística o la inmunosupresión, aumentan la posibilidad de infección con *P. aeruginosa*, lo cual conlleva a infecciones pulmonares graves (OMS, 2006).

Infecciones nosocomiales

Las infecciones contraídas por un paciente en el área clínica, en un período determinado (72 h después del ingreso), que fue internado por una razón diferente, se denominan infecciones nosocomiales. La persona internada en el centro de salud, no manifiesta la infección ni presenta la incubación al momento de la admisión. También comprenden las infecciones ocupacionales del personal que labora en el centro de salud (Bouvet, 1993).

Entre las causas de las infecciones nosocomiales se encuentran: la reducción de la inmunidad de los pacientes; el uso de técnicas médicas invasivas que pueden crear vías de infección; o el contagio de bacterias resistentes a los fármacos en poblaciones hacinadas en hospitales, donde las prácticas deficientes de control pueden facilitar la transmisión (OMS, 2002).

Infecciones respiratorias

P. aeruginosa es capaz de colonizar la mayor parte del cuerpo, creciendo preferentemente en medios aeróbicos. Se adapta rápidamente al tracto respiratorio, siendo el lugar más frecuente de invasión, y es la principal causa de infección en los pacientes con fibrosis quística u otras enfermedades respiratorias crónicas, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la neumonía asociada a ventilación

mecánica. Una vez en el hospedador, *P. aeruginosa* puede ocasionar bacteremia, definida como la presencia de bacterias en la sangre (Lloria, 2009; Smith y Nehring, 2017).

P. aeruginosa es uno de los microorganismos que se aísla en mayor proporción en las bronquiectasias, que se definen como una dilatación irreversible de la vía aérea con destrucción de la pared bronquial. Pueden desencadenarse por previas infecciones respiratorias, alteraciones congénitas y diferentes inmunodeficiencias. En el pulmón del paciente con bronquiectasia se crea un nicho ecológico ideal para la colonización bacteriana por microorganismos potencialmente patógenos (Cantón y col., 2009).

Infecciones recurrentes con *Pseudomonas aeruginosa*, son comunes en enfermedades pulmonares crónicas como EPOC, bronquiectasia y tuberculosis. Clínicamente, el mismo patrón de susceptibilidad a antibióticos en neumonías recurrentes luego de meses de tratamiento, sugiere que la neumonía causada por *P. aeruginosa*, se debe, predominantemente, por la reactivación de una cepa previa (recaída) más que por una reinfección exógena (Yum, 2014).

P. aeruginosa es uno de los principales microorganismos gramnegativos asociados a infecciones nosocomiales. El aumento en la frecuencia de la resistencia a antibióticos por parte de *P. aeruginosa* está relacionado con la limitación de la producción de nuevos antibióticos (Obritsch y col., 2005). La resistencia a antibióticos ocurre mediante un cambio en el material genético de la bacteria, por transferencia horizontal de genes o mutaciones espontáneas (Ventola, 2015).

Clasificación de los antibióticos

Un antimicrobiano es una molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de microorganismos. El término antibiótico se utiliza específicamente para hacer referencia al subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana. Los antibióticos ejercen una acción específica sobre estructuras o funciones de los microorganismos, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo (*Seija, 2008*).

Los antibióticos pueden clasificarse según su espectro de acción en: amplio (antibióticos activos sobre un extenso número de especies y géneros diferentes) o reducido (antibióticos activos sobre un limitado grupo de especies); según su mecanismo de acción en: inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la duplicación del DNA, inhibidores de la membrana citoplasmática o inhibidores de vías metabólicas (*Seija, 2008*).

Los antibióticos se dividen en diversos grupos: betalactámicos, glicopéptidos, aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas, dentro de los cuales pueden existir a su vez, diversas familias. Los betalactámicos son de origen natural o semisintético y se caracterizan por poseer un anillo betalactámico en su estructura; inhiben la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana en bacterias gramnegativas y grampositivas; no tienen efecto sobre micoplasmas (porque carecen de pared celular), ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*; se clasifican en cuatro grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenems (*Seija, 2008*).

Las penicilinas pueden ser de origen natural (producido por diferentes especies del género *Penicillium*) o semisintético; difieren unas de otras por sustituciones en la

posición 6 del anillo betalactámico, lo cual induce modificaciones en la actividad antibacteriana; dentro de este grupo se encuentran penicilinas naturales (G y V), oxacilina, meticilina, dicloxacilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, y piperacilina (Seija, 2008).

Las cefalosporinas son productos de fermentación de *Cephalosporium acremonium* y se dividen en cuatro generaciones: las cefalosporinas de primera generación son activas frente a cocos grampositivos, mientras que las sucesivas generaciones han perdido parte de esa actividad con una mayor actividad frente a bacilos gramnegativos; ejemplos de este grupo son cefazolina, cefuroxima, ceftazidima, cefepime, entre otras. Dentro de los monobactámicos se encuentra el aztreonam, este actúa frente a bacterias gramnegativas aerobias y facultativas. Los carbapenems presentan el mayor espectro de actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos. El imipenem fue el primer carbapenem desarrollado para uso clínico, es un derivado semisintético producido por el género *Streptomyces*, junto con el meropenem y ertapenem, poseen una actividad bactericida contra cocos grampositivos, algunas especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacteriaceae* y *Haemophilus* spp (Seija, 2008).

Los aminoglucósidos, otro grupo de antibióticos, se definen por la presencia de dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Se dividen en cuatro familias: estreptomicina, kanamicina (dentro de la cual se encuentra la amikacina), gentamicina y neomicina; presentan actividad contra los géneros *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* y contra enterococos (algunos resistentes a la gentamicina y estreptomicina). Se unen irreversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria (Seija, 2008).

Las quinolonas, se definen por presentar una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1. Se dividen en generaciones: la primera generación (ácido nalidíxico y ácido pipemídico) tiene actividad sobre enterobacterias, la segunda generación (norfloxacin y ciprofloxacina) actúa sobre *P. aeruginosa* y posee una actividad moderada sobre grampositivos, la tercera generación (levofloxacina, gatifloxacina) retienen la actividad sobre gramnegativos y mejoran la actividad sobre grampositivos, y la cuarta generación (moxifloxacina, trovafloxacina) retienen actividad sobre gramnegativos y aumentan la actividad sobre grampositivos. Las quinolonas interactúan con la DNA girasa (mayormente en bacterias gramnegativas) y la topoisomerasa IV (mayormente en bacterias grampositivas), inhibiendo la síntesis de DNA (*Seija, 2008*).

Mecanismos de resistencia a antibióticos

La resistencia mutacional ocurre cuando una bacteria perteneciente a una población susceptible desarrolla mutaciones en genes que afectan la actividad del antibiótico, resultado en la preservación del microorganismo en presencia del antimicrobiano. En general, cambios genéticos resultantes en resistencia a antibióticos alteran la acción del mismo mediante la modificación del blanco del antimicrobiano, la disminución del ingreso del antibiótico, la activación de mecanismos de eflujo que extraen la molécula nociva o cambios en vías metabólicas mediante la modulación de las redes de regulación (*Munita, 2016*).

La adquisición de material genético externo mediante transferencia horizontal es una de las principales vías responsable por el desarrollo de resistencia a antimicrobianos. La bacteria puede adquirir DNA externo mediante los procesos de transformación, transducción y conjugación. La transformación es el proceso más simple de transferencia horizontal, sin embargo, pocas son las especies de

microorganismos, en el área clínica, capaces de incorporar naturalmente DAN externo y desarrollar la resistencia. La aparición de bacterias resistentes en el ambiente hospitalario involucra comúnmente el proceso de conjugación, un mecanismo que implica el contacto entre células para el paso del material genético. Generalmente, en la conjugación se transfieren elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones (*Manson, 2010; Munita, 2016*).

Uno de los mecanismos más eficientes, por la acumulación de genes de resistencia, está representado por los integrones, sistemas de recombinación de sitios específicos capaces de reclutar marcos abiertos de lectura como *cassettes* de genes móviles. Los integrones proveen un eficiente y simple mecanismo para la adición de nuevos genes dentro del cromosoma bacteriano, junto con la maquinaria necesaria para asegurar su expresión (*Thomas, 2005*).

Dentro de las estrategias para hacer frente a la presencia de antibióticos, está la producción de enzimas que inactivan el antimicrobiano mediante la adición de restos químicos específicos al componente o que destruyen la molécula, representando la incapacidad del antibiótico de interactuar con su blanco (*Munita, 2016*).

Muchos de los antibióticos utilizados en el área clínica tienen blancos intracelulares o, en el caso de las bacterias gramnegativas, localizadas en la membrana interna. Por lo tanto, el antimicrobiano debe penetrar la membrana externa, en bacterias gramnegativas, o la membrana citoplasmática, en bacterias grampositivas, para ejercer su efecto. Las bacterias han desarrollado mecanismos para prevenir el ingreso del antibiótico y evitar la unión a su blanco mediante la disminución de la permeabilidad, limitando el influjo de compuestos desde el medio. Moléculas hidrofílicas, como betalactamasas, tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas, son particularmente afectadas por estos cambios de permeabilidad debido a que utilizan diversos canales de difusión

de agua, conocidos como porinas, para cruzar la barrera que representa la pared celular. La baja susceptibilidad innata de ciertos microorganismos se debe, parcialmente, al reducido número de porinas y/o la expresión diferencial de las mismas (*Hancock, 2002; Pages, 2008*).

La producción de maquinarias complejas capaces de extraer el compuesto tóxico del interior celular también resulta en un mecanismo de resistencia ante antibióticos. Estos sistemas pueden ser específicos para ciertos sustratos o con una amplia especificidad de sustratos. Este mecanismo de resistencia afecta a un extenso rango de antimicrobianos, incluidos inhibidores de la síntesis proteica, fluoroquinolonas, betalactamasas, carbapanems y polimixinas. Los genes que codifican para las bombas de eflujo pueden ser localizados en elementos genéticos móviles o en el cromosoma bacteriano. Los sistemas codificados en el cromosoma evidencian la resistencia intrínseca de ciertas especies a antibióticos particulares (*Poole, 2005; Munita, 2016*).

Biopelículas

Los microorganismos crean sus propios microambientes y nichos mediante la formación de biopelículas, las cuales consisten en agrupamientos de células adheridas a una superficie en una matriz conformada por sustancias poliméricas extracelulares, proteínas unidas a carbohidratos, pili, flagelos, otras fibras adhesivas y DNA extracelular. Esta envoltura corresponde aproximadamente al 90 % de la biomasa y estabiliza la estructura tridimensional. Las superficies son hábitats microbianos importantes debido a que los nutrientes se adsorben a las superficies y, por tanto, suelen contener más recursos que los que están disponibles para las células libres (*Kostakioti y col., 2013; Madigan y col., 2002; Prescott y col., 2002*).

En la matriz, los nutrientes son atrapados para uso metabólico por las bacterias residentes, y el agua es retenida de manera eficiente mediante puentes de hidrógeno con polisacáridos hidrofílicos. Los componentes estructurales de la matriz forman una alta tensión que mantiene próximas a las bacterias, permitiendo interacciones intracelulares e intercambio de DNA, protegen a la biopelícula de desecación, depredación, moléculas oxidantes, radiación y otros agentes dañinos. La naturaleza elástica de las biopelículas es parcialmente atribuida a la presencia de gradientes ambientales dentro de la biomasa que favorecen la formación de subpoblaciones de bacterias mostrando diferentes expresiones de genes en respuesta a nutrientes locales y disponibilidad de oxígeno (*Kostakioti y col., 2013*).

Ciclo vital de las biopelículas

El desarrollo de las biopelículas se clasifica en tres fases: adhesión, crecimiento y separación (*Nazar, 2007*). El primer paso involucra la adhesión de la bacteria a la superficie mediante movimiento browniano (movimiento vibratorio característico de las bacterias sésiles), fuerzas gravitacionales y fuerzas hidrodinámicas. El proceso está mediado por apéndices adhesivos extracelulares y adhesinas secretadas por el microorganismo. Es una fase dinámica y puede ser reversible: la bacteria puede separarse y volver a crecimiento libre. Esto ocurre si el microorganismo es perturbado por fuerzas hidrodinámicas, fuerzas repulsivas o en respuesta a la disposición de nutrientes. La adhesión alcanza una fase irreversible cuando la bacteria vence las fuerzas externas y mantiene un firme agarre en la superficie. Se presume que cada bacteria expresa diferentes sistemas de pili para facilitar la adherencia. Las características de las superficies, suavidad o aspereza, no afectan significativamente la colonización (*Donlan y Costerton, 2002; Kostakioti y col., 2013; Vázquez y col., 2011*).

P. aeruginosa como patógeno nosocomial, secreta la adhesina FimH mediante el pili tipo I, la cual permite la unión e invasión en humanos. Otras estructuras utilizadas para llegar a la adhesión irreversible, son los flagelos y el pili tipo IV. El pili tipo IV media la motilidad *twitching* (movimiento con contracciones que permite a la bacteria movilizarse a lo largo de una superficie) para superar la interfase líquida, lograr adherirse irreversiblemente sobre la superficie y movilizarse por la misma. Las fimbrias ensambladas por vía de una proteína chaperona, CupA, también están involucradas en la adherencia y autoagregación (*Klebensberger y col., 2009; Vallet y col., 2001*).

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza el crecimiento y maduración de la biopelícula. Existen factores desencadenantes en la superficie que permiten cambios en la expresión génica, favorecen el comportamiento sésil y la producción de componentes para la formación de la matriz. En *P. aeruginosa*, estos componentes varían según las condiciones ambientales (disponibilidad de nutrientes, pH, humedad, temperatura). Pel y Psl son sustancias poliméricas extracelulares. Psl aumenta tanto la adhesión a mucinas presentes en las vías respiratorias y células epiteliales, como la expresión del gen *pel*, presente en colonias encontradas en pacientes con fibrosis quística (*Kostakioti y col., 2013*).

La adhesina CdrA es secretada en respuesta a altos niveles del señalizador 3,5-ácido cíclico diguanilato (c-di-GMP), y se une a Psl para estabilizar la estructura de la biopelícula. El alginato, otro exopolisacárido secretado por *P. aeruginosa*, ha sido asociado en resistencias a antimicrobianos y a las defensas inmunes del hospedador durante infecciones crónicas. MucR diguanilato ciclasa (regulador asociado a membrana) activa la síntesis de alginato, presumiblemente, a altas concentraciones de c-di-GMP (*Kostakioti y col., 2013; Passerini y col., 2007*).

El DNA extracelular interviene en la comunicación intercelular en biopelículas. Estudios demuestran que las biopelículas inmaduras de *P. aeruginosa*, donde las sustancias poliméricas extracelulares no son tan abundantes, son más sensibles a tratamientos con DNA extracelular, lo cual evidencia su papel estabilizador en dichas comunidades (*Kostakioti y col., 2013; Whitchurch y col., 2002*).

Una vez que la biopelícula se ha formado y la matriz de exopolisacáridos ha sido secretada por las células bacterianas, la estructura resultante es altamente viscosa y elástica (*Donlan y Costerton, 2002*). La comunidad microbiana intercambia activamente productos que mantienen la estructura y favorecen la supervivencia. Las bacterias se han adaptado mediante mecanismos que les permite medir si es beneficioso seguir dentro de la biopelícula o volver al estilo de vida libre. Una vez que los microorganismos se desprenden de la biopelícula, vuelven a su forma libre (*Hall-Stoodley y col., 2004; Kostakioti y col., 2013*).

La separación puede darse por diversos factores: perturbaciones externas, como aumento del fluido circundante, alteraciones en la disponibilidad de nutrientes, fluctuaciones de oxígeno, aumento de los productos tóxicos, procesos internos dentro de las biopelículas, como degradación de enzimas endógenas, liberación de los exopolisacáridos o proteínas de unión a la superficie; o cualquier otra condición que induzca estrés (*Hall-Stoodley y col., 2004; Kostakioti y col., 2013*).

La principal causa de dispersión de biopelículas formadas por *P. aeruginosa*, es el aumento de diversas fuentes de carbono y nitrógeno. Estas respuestas se dan por cambios en la expresión génica. Una disminución en los niveles de c-di-GMP, favorece genes involucrados en la motilidad celular. La degradación de las sustancias exopoliméricas por parte de enzimas exógenas como la alginato liasa, también

contribuyen a la separación del microorganismo de la matriz. Las moléculas surfactantes disminuyen las interacciones intercelulares, fomentando la dispersión. Algunas subpoblaciones flageladas, dentro de las biopelículas, emigran, creando microcolonias con un vacío central. Los vacíos dentro de estas estructuras están relacionados a células muertas, lo que funciona como un mecanismo adicional de separación por parte de *P. aeruginosa* (Kostakioti y col., 2013).

Resistencia a antibióticos

La naturaleza de la estructura de las biopelículas y los atributos fisiológicos de los microorganismos, confieren una resistencia inherente a agentes antimicrobianos: antibióticos, desinfectantes o germicidas. Las moléculas antimicrobianas deben difundir a través de la matriz de la biopelícula para inactivar a las células revestidas. Las sustancias poliméricas extracelulares que constituyen la matriz, presentan barreras difusionales para estas moléculas antimicrobianas influenciando tanto la tasa de transporte hacia el interior de la biopelícula, como la reacción entre el antimicrobiano y los componentes de la matriz (Donlan y Costerton, 2002).

Otra propuesta de mecanismos de resistencia a agentes microbianos, recae en el crecimiento celular. Las células asociadas a las biopelículas crecen a un ritmo más lento que las células libres, obteniendo como resultando una absorción más lenta de los compuestos antimicrobianos (Donlan y Costerton, 2002).

P. aeruginosa está mayormente relacionada con la neumonía nosocomial adquirida. El desarrollo de la resistencia en *P. aeruginosa* a los antibióticos aumenta progresivamente a nivel mundial debido su uso excesivo. Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* representan graves problemas en los hospitales debido a que los pacientes en condiciones críticas pueden morir por neumonía causada por *P. aeruginosa* y la eliminación de *P.*

aeruginosa en pacientes con infecciones es complicada debido a la resistencia a diversos antibióticos (Yayan, 2015).

Metales pesados

Los metales pesados son elementos metálicos que tienen una densidad relativamente elevada, comparada con la del agua. Con la suposición de que el peso y la toxicidad están estrechamente relacionados (Tchounwou y col., 2012). Tienen aplicación directa en numerosos procesos de producción de bienes y servicios. Algunos de estos son: arsénico, cadmio, cobalto, cromo, cobre, mercurio, níquel, plomo, estaño, bario, zinc (Ferguson, 1990). Muchos metales pesados como el cromo, cobre, cobalto, molibdeno, zinc, entre otros, son necesarios en bajas cantidades en las células, pero una vez que se encuentran en niveles superiores a los requeridos, ejercen efectos tóxicos sobre las mismas (Navarro-Abiñoy col., 2007).

Aquellos metales pesados a los que no se le ha identificado una función específica en los requerimientos celulares, suelen ser altamente tóxicos, como es el caso del bario, cadmio, mercurio, plomo, antimonio y bismuto (Navarro-Abiño y col., 2007). Los metales iónicos interactúan con componentes celulares como el DNA y las proteínas nucleares, causando daños y cambios conformacionales que afectan el ciclo celular y pueden inducir la apoptosis (Tchounwou y col., 2012).

Bario

El Bario (Ba) es un elemento químico perteneciente al grupo de los metales pesados, su número atómico es el 56 y tiene un peso atómico de 137,34 g/mol. Ocupa el décimo octavo lugar en abundancia en la corteza terrestre, encontrándose en un 0,04 %. Reacciona con el agua fácilmente y es lo bastante activo químicamente para reaccionar

con la mayor parte de los no metales. El cloruro de bario (BaCl_2) se emplea en la purificación de sales (como el cloruro de sodio), ablandador de aguas de calderas y en preparaciones medicinales (*Lenntech, 2017*).

De forma natural el Ba puede ser encontrado en el medio ambiente a niveles muy bajos, sólo puede obtenerse en mayores cantidades en suelos y comida (frutos secos, algas, pescados y ciertas plantas) sin ser dañino. A concentraciones mayores que las naturales, el Ba es capaz de afectar la salud. Dependiendo de las concentraciones, la persona presenta dificultad para respirar, arritmia, dolor de estómago, debilidad muscular, inflamación en cerebro e hígado o cambios en los reflejos nervioso (*Lenntech, 2017*). No se conoce la función del Ba en los requerimientos celulares, sin embargo, se sabe que logra ser altamente tóxico (*Navarro-Abiñoy col., 2007*).

Resistencia a metales pesados

Altas concentraciones de un metal son tóxicas para los microorganismos por la posibilidad de cambios conformacionales en la estructura de los ácidos nucleicos y proteínas, e interferencias en diversos procesos biológicos. El estrés causado por metales puede afectar el crecimiento, morfología y metabolismo de la bacteria. Consecuentemente, los metales pesados pueden modificar el tamaño, composición y actividad de una comunidad microbiana, alterando la densidad y diversidad celular (*Poole, 1989; Giller, 1998; Oliveira, 2006; Wang, 2007*).

La presencia de metales pesados en el ambiente no solo causa selección en bacterias resistentes a metales, también pueden originar selección en bacterias resistentes a antibióticos, debido a que ciertos mecanismos de resistencia a metales pesados funcionan de manera similar a los procesos de resistencia a antibióticos.

Aunado a ello, es común asociar la resistencia a metales y a antimicrobianos debido a que ambos genes de resistencia se encuentran, frecuentemente, en los mismos elementos genéticos móviles. Consecuentemente, se asume que la presión selectiva aplicada para metales pesados, contribuyen a la selección indirecta de microorganismos resistentes a antibióticos, particularmente en ambientes contaminados con ambos elementos (*Lima, 2012; Zampieri, 2016*).

Diversos son los mecanismos de resistencia que poseen las bacterias para tolerar los efectos nocivos de los metales pesados. Entre esos procesos se encuentran los que involucran componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando la toxicidad de los metales, enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, transformándolos en formas menos tóxicas, y transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular. Estos procesos se caracterizan por reguladores que controlan la expresión de genes que codifican productos específicos para iones metálicos (*Cervantes y col., 2006; Hobman y Crossman, 2014*).

ANTECEDENTES

Estudios a nivel internacional

A nivel mundial *P. aeruginosa* está clasificada entre Las bacterias más resistentes a antimicrobianos conocidos por el hombre. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en un comunicado de prensa del año 2017, publicó la lista de los patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, entre los cuales se ubicó a *P. aeruginosa* con prioridad crítica que afecta la salud humana. Es un problema sanitario que se ha ido agravando con el tiempo, ya que esta misma organización en su escrito *Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos*, incluye a *P. aeruginosa* entre los patógenos causantes de enfermedades nosocomiales por uso inadecuado en hospitales y promoción de medicamentos (OMS, 2001; OMS, 2017).

Diversos son los estudios que se han realizado con *P. aeruginosa* a lo largo de los años, enfocados tanto en su formación de biopelículas, como en su resistencia a diversos compuestos, donde detallan la formación de las biopelículas, su estructura y las infecciones humanas en las cuales participan (endocarditis, otitis media, prostatitis, fibrosis quística y periodontitis), así como también los instrumentos médicos a los que se encuentran asociados (válvulas cardíacas protésicas, catéteres venosos centrales, catéteres urinarios, lentes de contacto, equipos intrauterinos y en las líneas de agua de las unidades dentales) (Donlan y Costerton, 2002).

Los investigadores proponen mecanismos de formación de biopelículas en base a las diferentes enfermedades (separación o agregados celulares, resistencia al sistema inmune del hospedador y nichos provisionales para la formación de organismos

resistentes) y cómo atacarlas con antibióticos según su lugar de formación basados en estudios previos. Por último, exhortan al desarrollo de nuevas vacunas y antibióticos que actúen directamente en la biopelícula y profundizar en los estudios de las causas y medios de control de las diversas enfermedades causadas por el mencionado microorganismo (*Donlan y Costerton, 2002*).

La colonización de *P. aeruginosa* a través de los dispositivos de respiración mecánica en pacientes con bronquiectasia en situación clínica estable, es una vía común de contaminación. Estudios con cultivos de esputo, corroboran que estos pacientes tienen una alta prevalencia a la colonización por microorganismos potencialmente patógenos, entre los cuales se encuentra *P. aeruginosa* (*Angrill y col., 2002*).

A pesar de las extensas investigaciones, las infecciones respiratorias causadas por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística ocurren continuamente. La fibrosis quística es causada por mutaciones en el regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) de un canal de cloro, que se encuentra principalmente en las membranas apicales de las células epiteliales. Se ha demostrado que pacientes con fibrosis quística manifiestan un defecto en la defensa del hospedador localizado en las superficies respiratorias, permitiendo la colonización mediante biopelículas (*Parsek y Singh, 2003*).

Existen dos etapas clínicas para la enfermedad: en la primera, el paciente desarrolla infecciones respiratorias intermitentes con una variedad de microorganismos (*Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, P. aeruginosa*). La segunda etapa corresponde a una infección permanente con *P. aeruginosa* (formando biopelículas) y puede durar años, se disminuyen las funciones pulmonares y aumentan síntomas respiratorios. Uno de los aspectos más distintivos en el paso de una fase a otra es la

aparición de *P. aeruginosa* con un fenotipo mucoso (sobreproducción de alginato) que le permite la adaptación (Parsek y Singh, 2003).

Conociendo el proceso de colonización de *P. aeruginosa* en el área clínica, se pueden enfocar con mayor facilidad los estudios de susceptibilidad a diversos antimicrobianos, y así, dar una respuesta más rápida a la problemática de resistencia a antibióticos de los principales patógenos nosocomiales.

La resistencia de *P. aeruginosa* a diversos metales pesados también ha sido estudiada, tomando en cuenta tanto en crecimiento libre como en biopelículas. Uno de los estudios fue emprendido con el fin de examinar los efectos de metales como el cobre, plomo y zinc, en ambas formas de crecimiento, obteniendo que el microorganismo fue mucho más resistente bajo estrés de metales pesados creciendo en biopelícula, que en el crecimiento libre. Dentro de este último encontraron a su vez, que las bacterias en crecimiento exponencial fueron más resistentes bajo tratamientos de cobre y plomo que aquellas en fase estacionaria (Teitzel y Parsek, 2003).

Los investigadores plantean como posible explicación que los polisacáridos que conforman la matriz que envuelve a las células dentro de la estructura, pueden ser responsables de la protección de los microorganismos ante el estrés por metales pesados, mediante la unión entre las sustancias poliméricas y los metales, lo cual retrasa el proceso de difusión dentro de la biopelícula (Teitzel y Parsek, 2003).

Entre las investigaciones que evalúan fenotipos de resistencia de los diversos microorganismos, ha sido estudiada la sensibilidad de cepas a desinfectantes de uso común. Carvalho y colaboradores en el año 2005, evaluaron la susceptibilidad de aislados clínicos de *P. aeruginosa* a desinfectantes hospitalarios que presentan

compuestos de amonio cuaternario, obteniendo un 71 % de aislados multirresistentes a diversos antibióticos (ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulánico, ceftazidima, cefepima, imipenem, axtreonam, gentamicina, amikacina, tobramicina, ciprofloxacina, norfloxacina, tetraciclina y trimetropin/sulfametoxazole); definiendo como multirresistentes a aquellos aislados capaces de desarrollarse frente a agentes antimicrobianos en dos o más de los grupos de antibióticos estudiados. También reportaron que un 43 % de los aislados presentaron una baja susceptibilidad al desinfectante, recomendando futuras investigaciones con diversos microorganismos y el efecto de agentes químicos capaces de ser utilizados como biocidas (*Carvalho, 2005*).

Otras investigaciones han tenido como objetivo el uso de compuestos diferentes a los antibióticos que sean efectivos para atacar las biopelículas formadas por *P. aeruginosa*. Banin y colaboradores en el año 2006, estudiaron el efecto del EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) sobre estas estructuras, obteniendo que el EDTA es un fuerte inhibidor de biopelículas, siendo más efectivo al momento de erradicarlas que la gentamicina, y obteniendo también que la suma de ambos compuestos presenta una eficacia total cuando crecen bajo un flujo en una superficie de vidrio (*Banin y col., 2006*).

Existen estudios relacionados con el uso de compuestos de metales pesados sobre biopelículas que, mediante futuras investigaciones, pueden ser útiles en el área clínica. Un ejemplo de esto es el estudio de Aninwene y colaboradores en el año 2013, donde emplean partículas de nano sulfato de bario (Nano-BaSO₄) basándose en su actividad que disminuye las interacciones intercelulares dentro de las biopelículas, sin necesidad del uso de antibióticos. Obtuvieron que al añadir Nano-BaSO₄ en poliuretanos termoplásticos (polímeros utilizados en la industria médica) se desarrollan

propiedades antimicrobianas, comparado con el uso común del poliuretano, lo que garantiza un amplio rango de investigación para futuros estudios (*Aninwene y col., 2013*).

Estudios a nivel nacional

En Venezuela también pueden conseguirse diversos estudios relacionados con *P. aeruginosa* y su capacidad de formación de biopelículas o su resistencia a los diferentes antimicrobianos.

Los estudios sobre los productos excretados por *P. aeruginosa* durante la formación de biopelículas, basados en su medio de crecimiento, varían. Mediante pruebas moleculares, los investigadores encontraron que los exoproductos producidos por *P. aeruginosa* en los cultivos, difieren en comparación a los excretados durante la infección clínica, con lo cual se manifiesta la existencia de procesos regulatorios diferentes en la expresión de los genes según el ambiente en el que se encuentre *P. aeruginosa* (*Polanco y col., 2006*).

Sánchez y colaboradores en el año 2008, observaron un incremento de cepas resistentes a los antibióticos beta-lactámicos, causado principalmente por la producción de enzimas beta-lactamasas, que corresponden, en muchos casos, a la única opción terapéutica. Mediante ensayos fenotípicos y moleculares lograron evidenciar que todas las cepas estudiadas presentaban esta enzima, lo cual les confiere un alto nivel de resistencia a todos los antibióticos beta-lactámicos (con excepción del aztreonam) (*Sánchez y col., 2008*).

Por su parte, Pérez y colaboradores en el año 2015, obtuvieron cepas de *Staphylococcus aureus* capaces de formar biopelículas en las adenoides de pacientes

que presentaban hipertrofia adenoidea o adenoiditis periódica. Obtuvieron que el tejido adenoideo sirve a las bacterias productoras de biopelículas como reservorio para su crecimiento, siendo la causa de las infecciones del tracto respiratorio superior (Pérez y col., 2015).

En el Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos del Instituto de Biología Experimental, Bazdikian en el año 2013, evaluó la resistencia de *Escherichia coli* en crecimiento libre a diversos metales pesados, bario, cobre, estroncio, cobalto y molibdeno, mediante técnicas microbiológicas, en pacientes con infecciones del tracto urinario. Reportó cepas sensibles al cobre (2 mM) y cobalto (5 mM) y resistentes al bario (500 mM), estroncio (200 mM) y molibdeno (250 mM). Evaluando la trasmisibilidad, obtuvo transferencia de genes de resistencia a cobre y cobalto (Bazdikian, 2013).

Por su parte, Ramos en el año 2014, realizó el primer reporte a nivel nacional que compara el patrón de resistencia a los desinfectantes de amonio cuaternario en los patógenos *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*, en dos formas de crecimiento: células libres y biopelículas. Obtuvo que ciertas cepas estudiadas fueron resistentes al desinfectante. A nivel molecular sugiere que los genes de la familia *qac*, que codifican para proteínas que expulsan como sustrato preferencial desinfectantes de amonio cuaternario, pudiesen estar involucrados, mediante las bombas de eflujo, en la resistencia de *A. baumannii* y *S. maltophilia* (Ramos, 2014).

Sanabria, en el 2015, realizó estudios con aislados de *Klebsiella pneumoniae*, en crecimiento libre, evaluando el fenotipo de resistencia a vanadio y la trasmisibilidad de sus plásmidos, obteniendo que a la máxima concentración, del metal, estudiada (500

mM) las cepas fueron resistentes y eran capaces de transferir plásmidos (*Sanabria, 2015*).

La resistencia a antibióticos y desinfectantes por parte de diversos microorganismos ha aumentado con el paso de los años, reduciendo los compuestos eficaces para inhibir el desarrollo de las bacterias. Esta problemática es aún mayor en el área clínica, afectando la salud de los pacientes, y por ende su calidad de vida.

No solo los mecanismos de transmisión de genes han incrementado la cantidad de cepas resistentes, sino también la formación de agregados celulares que les confiere una mayor protección contra los agentes biocidas utilizados. Diversas son las investigaciones con metales pesados como sustancias antimicrobianas, sin embargo, pocos de estos compuestos han sido profundamente estudiados.

Las investigaciones realizadas con bario como inhibidor del desarrollo microbiano son escasas, sin embargo, han tenido resultados favorables como agente antimicrobiano, por lo que podría considerarse como una alternativa en la búsqueda de nuevas sustancias bactericidas que puedan ser utilizadas en el área clínica y en cualquier otro sistema afectado por la presencia de los diversos patógenos.

Es importante resaltar que son aún menores los estudios que relacionan la resistencia a metales pesados, en particular al bario, con la formación de biopelículas, específicamente, en *P. aeruginosa*, lo cual lo convierte en un campo alternativo de investigación que puede traer grandes beneficios clínicos, ampliando el uso de sustancias antimicrobianas más allá de los antibióticos, para erradicar uno de los principales patógenos nosocomiales oportunistas, como es *P. aeruginosa*, y así mejorar la calidad de vida de los pacientes.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el fenotipo de resistencia a cloruro de bario en aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, creciendo en biopelículas, provenientes de infecciones respiratorias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Corroborar mediante pruebas microbiológicas, la presencia de *P. aeruginosa* en las muestras provenientes de infecciones respiratorias.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria, evaluando el crecimiento en medio líquido, de aislados de *P. aeruginosa* al cloruro de bario (BaCl_2).
- Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de *P. aeruginosa*, provenientes de infecciones respiratorias, en microplacas de poliestireno.
- Evaluar la resistencia de aislados de *P. aeruginosa*, provenientes de infecciones respiratorias, creciendo en biopelículas, al cloruro de bario (BaCl_2).
- Clasificar los aislados de *P. aeruginosa* según su capacidad de formación de biopelículas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas provenientes de infecciones respiratorias utilizadas (Tabla I), corresponden a muestras anónimas previamente aisladas, caracterizadas y conservadas como *Pseudomonas aeruginosa*, donadas gentilmente por el personal que labora en el Laboratorio AVILAB. A su vez, el protocolo cuenta con la aprobación por parte del Comité de Bioética de la Clínica El Ávila.

Los aislados del Hospital Universitario de Caracas (HUC) (Tabla I) fueron previamente caracterizados y conservados por Chalbaud, en el año 2010, en el Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos (LBP) del Instituto de Biología Experimental (IBE) (Chalbaud, 2010) y en el Centro Venezolano de Colección de Microorganismo (CVCM).

La cepa de referencia *E. coli* K12 J62-2 (código CVCM 131) utilizada como control, fue donada por el Centro Venezolano de Colección de Microorganismo (CVCM); mientras que la cepa MPAO-1 (*P. aeruginosa*) fue previamente caracterizada por Chalbaud, en el año 2010, en el Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos (LBP) del Instituto de Biología Experimental (IBE) (Chalbaud, 2010).

Tabla I. Procedencia y nomenclatura de las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas y los controles utilizados.

Código	Procedencia	Muestra
PB1	Paciente	Secreción traqueal
PB4	Paciente	Secreción traqueal
PB13	Paciente	Secreción traqueal
PB16	Paciente	Secreción traqueal
PB17	Paciente	Secreción traqueal
PB20	Paciente	Secreción traqueal
PB25	Paciente	Secreción traqueal
PB26	Paciente	Secreción traqueal
PN3	Ambiental	Fregadero
PN5	Ambiental	Fregadero
PN20	Ambiental	Fregadero
PU5	Ambiental	Cama
1432	UTI	Lavado bronquial
9161	Ambulatorio	Espujo
10646	Emergencia	Espujo
10781	UTI	Secreción endotraqueal
11019	UTI	Secreción endotraqueal
11029	UTI	Secreción endotraqueal
12230	Ambulatorio	Espujo
14424	Ambulatorio	Espujo
16445	Hospitalización	Espujo
S/N	Hospitalización	Secreción endotraqueal
MPAO1	Control	-
N-694	Control	-
J62-2	Control	-
765	Control	-

PB: muestras de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes del HUC; PN: muestras de *P. aeruginosa* aisladas del ambiente del Servicio de Neonatología del HUC; PU: muestras de *P. aeruginosa* aisladas del ambiente de la UTI del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con infecciones respiratorias; UTI: Unidad de Terapia Intensiva; MPAO1; N-694: *P. aeruginosa*; J62-2; 765: *E. coli*.

Cultivo de las cepas bacterianas aisladas de muestras del HUC y de pacientes con infecciones respiratorias

Cada muestra se sembró en agar cetrimida (preparado bajo las indicaciones de la empresa farmacéutica Merck) a partir de caldo nutritivo (preparado bajo indicaciones de la empresa Oxoid) y se colocó a incubar durante 24 h a 37 °C.

Corroboración de especie de las muestras en estudio

A cada muestra se le realizó una serie de pruebas para confirmar su identidad dentro del género, entre estas se encuentran: tinción Gram, catalasa, oxidasa, Kligler y citrato (McFaddin, 2004).

Tinción Gram

Se añadió una gota de solución salina (a una concentración del 0,85 %) sobre una lámina portaobjeto, se le agregó un inóculo de una colonia aislada en agar cetrimida, se generó el *frotis* utilizando una colonia pura de la placa con crecimiento. Se fijó la muestra con ayuda del mechero. Se agregó violeta de Genciana y luego de 1 min se retiró con agua destilada. Se añadió lugol y pasado 1 min se lavó con agua destilada. Se agregó una solución de alcohol-acetona (proporción 3:1). Se añadió safranina y transcurridos 30 s se lavó con agua destilada. Se visualizó al microscopio; las células rosadas se clasificaron como gramnegativas, mientras que las moradas como grampositivas.

Prueba catalasa

Comprueba la presencia de la enzima catalasa, presente en géneros de *Pseudomonas*. Se extendió una colonia aislada en agar cetrimida en una lámina portaobjeto, y se agregó una gota de agua oxigenada. Se evaluó la presencia (prueba positiva) o ausencia (prueba negativa) de burbujas.

Prueba oxidasa

Detecta la enzima citocromo-c-oxidasa, presente en géneros de *Pseudomonas*. En un papel de filtro se agregó una gota del reactivo oxidasa (tetrametil-p-fenilendiamina), se añadió un inóculo de una colonia aislada en agar cetrimida. Se consideró una prueba positiva si luego de 10 s ocurría un cambio de color violáceo, de lo contrario se consideró negativa.

Agar Hierro Kligler

Determina la capacidad de un microorganismo de utilizar un carbohidrato específico (lactosa y glucosa) incorporado en el medio con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico. Se preparó bajo las indicaciones de la empresa Himedia. *Pseudomonas aeruginosa* no fermenta la lactosa ni la glucosa, obteniendo el bisel y el taco de color rojo, ni produce gases o ácido sulfhídrico.

Prueba del citrato

Determina si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad. Se preparó bajo las indicaciones de la empresa Oxoid. Se consideró positiva la prueba si se observaba crecimiento con

un color azul intenso en el bisel, en caso de no observar crecimiento ni cambio de color (verde) se consideró negativa.

Determinación de resistencia a antibióticos

Método de susceptibilidad por difusión de disco (Kirby-Bauer)

El propósito de esta técnica es determinar la sensibilidad o resistencia de aerobios patógenos y anaerobios facultativos a diversos compuestos antimicrobianos. El microorganismo se siembra en agar Müeller-Hinton (preparado bajo indicaciones de la empresa Oxoid) en presencia de antimicrobianos impregnados en discos de papel de filtro. La presencia o ausencia de crecimiento alrededor de los discos es una medida de la habilidad del antimicrobiano de inhibir, o no, al microorganismo (*Hudzicki, 2009*).

Los estándares McFarland son suspensiones de sulfato de bario o partículas de látex que permiten comparar visualmente la densidad bacteriana. Comercialmente existen estándares preparados. Un estándar 0,5 McFarland equivale a una suspensión bacteriana entre 1×10^8 y 2×10^8 de *E. coli*. Inoculando la cepa en estudio en solución salina, desde una placa de agar, se comparó el resultado con el estándar McFarland (se colocó uno al lado del otro, el inoculo y el patrón, y se compararon las soluciones). Si la solución se observó más clara que el patrón, se resuspendió un número mayor de colonias. Si al contrario se, observó más turbio, se realizaron diluciones con solución salina (*Hudzicki, 2009*).

Utilizando un hisopo estéril, se sembró un césped bacteriano, rayando sobre el medio en cuatro direcciones diferentes, de forma uniforme. Los discos de antibióticos fueron colocados sobre el medio, utilizando una pinza estéril, a longitudes equidistantes. Se incubó la placa durante 24 h a 37 °C y se midió el halo formado alrededor de cada disco. Los puntos de corte de los diámetros de la zona de inhibición utilizados para las

cepas de *P. aeruginosa* del presente estudio son los recomendados por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2017), el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, 2017) y el Comité de Antibiógramas de la Sociedad Francesa de Microbiología (CSFM, 2001).

Los antibióticos utilizados se presentan en la Tabla II; aquellos antimicrobianos a los que *P. aeruginosa* presenta resistencia intrínseca fueron seleccionados para la corroboración del fenotipo.

Tabla II. Concentración de los discos de antibiótico comerciales para la técnica de determinación de los perfiles de resistencia de *P. aeruginosa*.

Antibiótico	Concentración (µg)
AMK	30
AMP	10
AMX	30
STR	10
IMP	10
KAN	30
MEM	10
TET	30

AMK: amikacina; AMP: ampicilina; AMX: amoxicilina; STR: estreptomina; IMP: imipenem; KAN: kanamicina; MEM: meropenem; TET: tetraciclina.

Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

La concentración mínima inhibitoria (MIC) se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que puede inhibir el crecimiento de un microorganismo luego de una noche de incubación (Andrews, 2005). Utilizando el BaCl₂ como antimicrobiano, se evaluó el crecimiento en medio líquido de los aislados en estudio. Las muestras de *P. aeruginosa* se cultivaron en caldo LB y luego de incubadas durante 24 h a 37 °C, se añadió metal a concentraciones crecientes (5, 10, 15, 20, 25, 50 mM). Se incubaron

durante 24 h a 37 °C y se realizaron diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}), sembrando 10 µL de cada dilución (por quintuplicado) en una placa de agar nutritivo (AN). El volumen a agregar en cada tubo se calculó con la relación matemática: $V_1C_1 = V_2C_2$, donde V_1 correspondió al volumen de BaCl₂ a agregar en cada tubo, C_1 la concentración del *stock* de BaCl₂ (1000 mM), V_2 el volumen de caldo en el tubo, C_2 la concentración a evaluar. Luego de incubar durante 24 h a 37 °C, se evaluó el crecimiento de las cepas.

Crecimiento de biopelícula en microplacas de poliestireno

Se procedió al cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en caldo Luria Bertani (LB) (preparado bajos las indicaciones de la empresa Oxoid) y luego de incubado durante 24 h a 37 °C, se añadieron 200 µL de caldo en cada pozo de una microplaca de poliestireno de 96 pozos (realizado por duplicado). En cada microplaca se promovió el crecimiento de las cepas estudiadas bajo el siguiente orden: la primera y doceava fila correspondieron a los blancos (caldo LB); las cepas se colocaron entre la segunda y décimo primera fila. Se incubó durante 24 h a 37 °C. Se extrajo el medio presente en cada pozo y se agregó caldo LB sin inóculo; se incubó por 24 h a 37 °C. Este procedimiento de recambio se realizó durante dos días seguidos. Al tercer día se repitió el procedimiento agregando BaCl₂ (dilución 1:10) al caldo LB a las siguientes concentraciones: 0, 50, 100 y 150 mM. Se incubó por 24 h a 37 °C, se extrajo el medio de los pozos y se agregó solución cristal violeta (0,01 %) durante 30 min. Se retiró y se añadió etanol (95 %). Transcurridos 10 min, se midió la densidad óptica, tanto para los controles como para cada muestra, en un lector de Elisa (CPD reader 2112) a una longitud de onda de 630 nm.

Procesamiento de resultados

Para clasificar a los diferentes aislados según su capacidad de formación de biopelículas, se evaluó la relación entre las densidades ópticas (DO) de los blancos y las DO de los pozos inoculados con *P. aeruginosa*. Se estableció un punto de corte, definido como el valor obtenido de la DO promedio de los blancos más tres veces su desviación estándar (DOc). También se calculó el promedio de las densidades ópticas de los pozos inoculados (DOm). Se consideró no formadora de biopelícula si $DOm \leq DOc$, formadora de biopelícula débil si $DOm \leq 2xDOc$, formadora de biopelícula moderada si $2xDOc < DOm \leq 4xDOc$ o formadora de biopelícula fuerte si $DOm > 4xDOc$ (Fung y col., 2017; Passerini y col., 2007).

RESULTADOS

Corroboración de especie de las muestras en estudio, provenientes de muestras del HUC y pacientes con infecciones en el tracto respiratorio

Luego de recopiladas las muestras provenientes del Laboratorio AVILAB y del HUC, se trabajó con un total de 22 aislados de *P. aeruginosa*, a las cuales se les confirmó el fenotipo mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas. Todas las cepas fueron clasificadas como bacilos gramnegativos mediante la tinción Gram (se observaron células con forma alargada y de color rosado). Las pruebas catalasa y oxidasa fueron positivas para todas las cepas (presencia de burbujas y coloración violeta, respectivamente). En la prueba del agar hierro Kligler, todas las cepas fueron clasificadas como no fermentadoras y no productoras de gas ni de ácido sulfhídrico (tanto en el taco como el bisel se obtuvo una coloración rojiza y no se observó presencia de burbujas ni ennegrecimiento). Para la prueba del citrato se obtuvo que todas las cepas son capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono, observándose un cambio de color en el bisel de verde a azul (positivas). Todas las cepas fueron capaces de crecer en agar cetrimida donde se observaron pigmentos característicos de la especie: piocianina (verde brillante), piorrubina (rojo) y piomelanina (marrón).

Los resultados obtenidos en las pruebas concuerdan con lo esperado para este género bacteriano, por lo que se sugiere la presencia de *P. aeruginosa* en los diferentes aislados.

Determinación de resistencia a antibióticos de las cepas provenientes de infecciones en el tracto respiratorio

En la Tabla III se observa la clasificación de los aislados, provenientes de muestras respiratorias, según su resistencia a los ocho antibióticos estudiados. Se obtuvo que nueve de las diez cepas estudiadas (90 %) son resistentes a la ampicilina. Con respecto a la amoxicilina y a la estreptomina, las diez cepas estudiadas (100 %) son resistentes a ambos antibióticos. Para el imipenem y el meropenem se obtuvo que dos de las diez cepas estudiadas (20 %) son resistentes a los antibióticos. Se consiguió también, que ocho de las diez cepas estudiadas (80 %) son resistentes a la kanamicina y tetraciclina. Por el alto porcentaje de cepas resistentes (entre 80 y 100%), la ampicilina, amoxicilina, estreptomina, kanamicina y tetraciclina no son antibióticos efectivos en el tratamiento de *P. aeruginosa*, a diferencia de los carbapenems que presentaron un bajo porcentaje de aislados resistentes (20%). Los controles de resistencia y sensibilidad utilizados fueron las cepas N-694 (*P. aeruginosa*) y 765 (*E. coli*), respectivamente.

Tabla III. Clasificación de las cepas, provenientes de muestras respiratorias, según su resistencia a los antibióticos estudiados.

Cepa	AMK	AMP	AMX	STR	IMP	KAN	MEM	TET
1432	R	R	R	R	R	R	R	R
9161	R	R	R	R	S	R	S	S
10646	R	R	R	R	S	R	S	R
10781	S	R	R	R	S	R	S	S
11019	S	R	R	R	S	S	S	R
11029	S	R	R	R	S	S	S	R
12230	R	R	R	R	R	R	R	R
14424	R	S	R	R	S	R	S	R
16445	S	R	R	R	S	R	S	R
S/N	R	R	R	R	S	R	S	R

AMK: amikacina; AMP: ampicilina; AMX: amoxicilina; STR: estreptomicina; IMP: imipenem; KAN: kanamicina; MEM: meropenem; TET: tetraciclina; R: resistente; S: sensible.

En la Tala IV se presentan los perfiles de resistencia obtenidos, para las muestras provenientes de infecciones respiratorias, a los antibióticos estudiados. Se observan siete patrones, siendo la amoxicilina y la estreptomicina los antibióticos en común para todos los perfiles.

Tabla IV. Perfiles de resistencia, de las cepas provenientes de infecciones respiratorias, a los antibióticos estudiados.

Perfil de resistencia	Cepas
AMK, AMP, AMX, STR, IMP, KAN, MEM, TET	1432, 12230
AMK, AMP, AMX, STR, KAN, TET	10646, S/N
AMK, AMP, AMX, STR, KAN	9161
AMK, AMX, STR, KAN, TET	10781
AMP, AMX, STR, KAN, TET	11019, 11029
AMP, AMX, STR, KAN	14424
AMP, AMX, STR, TET	16445

AMK: amikacina; AMP: ampicilina; AMX: amoxicilina; STR: estreptomicina; IMP: imipenem; KAN: kanamicina; MEM: meropenem; TET: tetraciclina.

En la Figura 1 se presentan los porcentajes de resistencia de las cepas en estudios a diversos antibióticos (AMK, AMP, AMX, STR, IMP, KAN, MEM, TET) mediante el método de difusión de disco. Los porcentajes de cepas resistentes varían entre un 20 % (IMP, MEM) y un 100 % (AMX, STR).

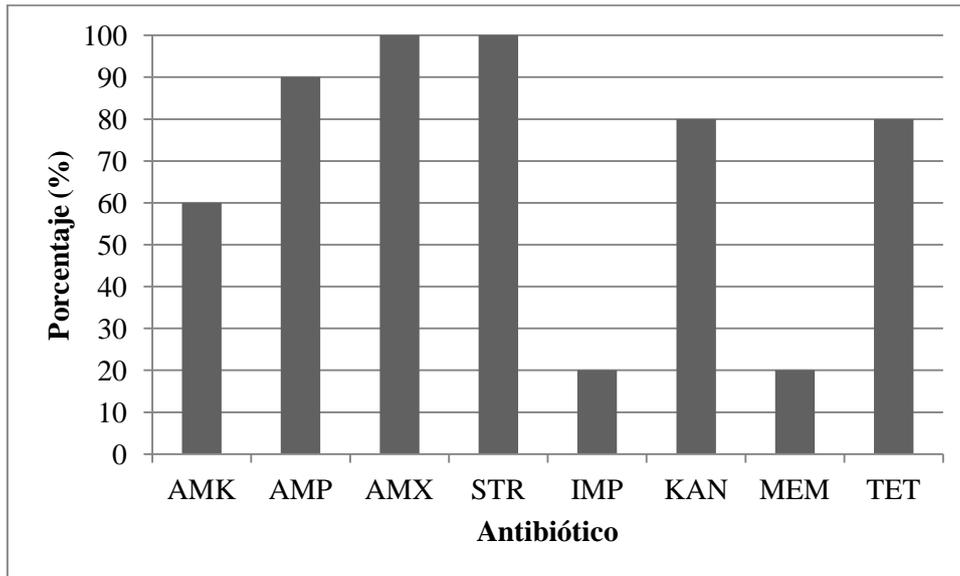


Figura 1. Porcentaje de resistencia de cepas en estudio a diversos antibióticos mediante el método de difusión. AMK: amikacina; AMP: ampicilina; AMX: amoxicilina; STR: estreptomicina; IMP: imipenem; KAN: kanamicina; MEM: meropenem; TET: tetraciclina.

Aproximación de la MIC

En la Tabla V se observan los patrones de resistencia a BaCl₂, de las cepas del HUC y los aislados de pacientes con infecciones respiratorias, mediante MIC, observando crecimiento solo de la cepa de *E. coli* a las concentraciones estudiadas en medio líquido (5, 10, 15, 20, 25, 50 mM).

Tabla V. Fenotipo de resistencia de cepas en estudio a BaCl₂ mediante MIC en medio líquido.

Cepa	Concentración BaCl ₂ (mM)					
	5	10	15	20	25	50
PB1	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PB4	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PB13	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PB16	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PB17	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PB20	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PB25	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PB26	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PN3	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PN5	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PN20	SC	SC	SC	SC	SC	SC
PU5	SC	SC	SC	SC	SC	SC
1432	SC	SC	SC	SC	SC	SC
9161	SC	SC	SC	SC	SC	SC
10646	SC	SC	SC	SC	SC	SC
10781	SC	SC	SC	SC	SC	SC
11019	SC	SC	SC	SC	SC	SC
11029	SC	SC	SC	SC	SC	SC
12230	SC	SC	SC	SC	SC	SC
14424	SC	SC	SC	SC	SC	SC
16445	SC	SC	SC	SC	SC	SC
S/N	SC	SC	SC	SC	SC	SC
MPAO-1	SC	SC	SC	SC	SC	SC
J62-2	C	C	C	C	C	C

SC: sin crecimiento; C: crecimiento

Clasificación de las cepas en estudios según la capacidad de formación de biopelículas en ausencia y presencia de BaCl₂

En la Tabla VI, se presentan los parámetros para la clasificación de los aislados, según su capacidad de formación de biopelículas, en ausencia de BaCl₂. De las muestras

del HUC fueron seleccionadas 6 aislados considerados representativos para realizar las comparaciones con las muestras de infecciones respiratorias. Los controles solo fueron estudiados en ausencia de BaCl₂ ya que no se conoce su comportamiento bajo las condiciones restantes estudiadas.

Tabla VI. Parámetros para la clasificación de las cepas, según su formación de biopelícula, en ausencia de BaCl₂.

Cepa	Desvest	DOm	Clasificación
PB12	0.018	0.258	D
PB16	0.018	0.267	D
PB20	0.012	0.317	M
PB23	0.012	0.316	M
PN3	0.012	0.224	D
PU5	0.012	0.269	M
1432	0.007	0.290	M
9161	0.001	0.235	M
10646	0.000	0.331	M
10781	0.009	0.235	M
11019	0.009	0.224	M
11029	0.009	0.216	D
12230	0.000	0.380	M
14424	0.009	0.206	D
16445	0.008	0.253	M
S/N	0.001	0.225	M
J62-2	0.007	0.219	D
MPAO1	0.002	0.246	M

Desvest: desviación estándar; DOm: densidad óptica promedio de la muestra; D: formadora de biopelícula débil; M: formadora de biopelícula moderada.

En la Figura 2 se muestran las DO de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en ausencia de BaCl₂ (0 mM), observándose valores que

oscilan, aproximadamente, entre 0.200 y 0.380, para las cepas 14424 y 12230, respectivamente.

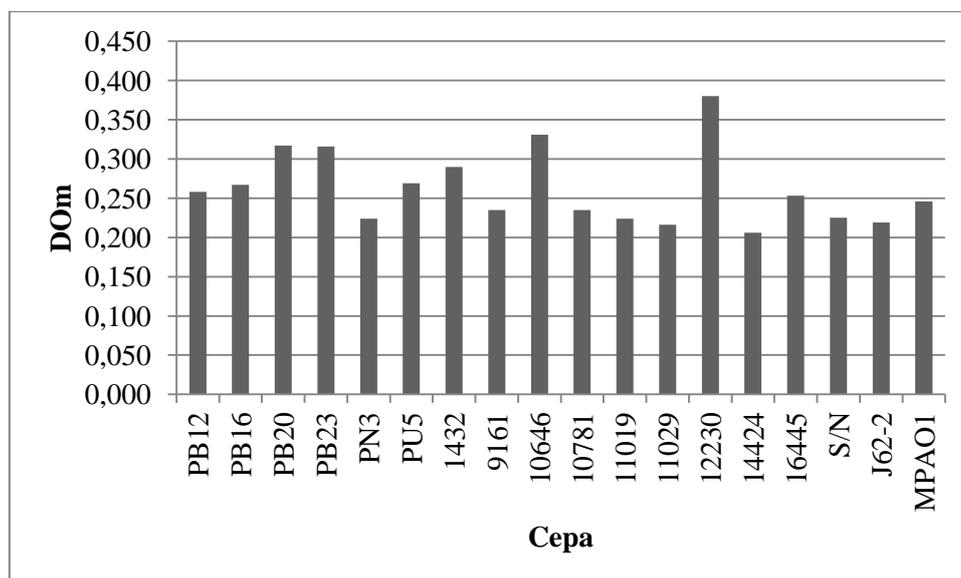


Figura 2. DO promedio de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en ausencia de $BaCl_2$ (0 mM). DOM: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de *P. aeruginosa* aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.

En la Tabla VII, se presentan los parámetros para la clasificación de los aislados, según su capacidad de formación de biopelículas, en presencia de $BaCl_2$ (50 mM).

Tabla VII. Parámetros para la clasificación de las cepas, según su formación de biopelícula, en presencia de BaCl₂ (50 mM).

Cepa	Desvest	DOm	Clasificación
PB12	0.001	0.271	D
PB16	0.001	0.206	D
PB20	0.011	0.260	D
PB23	0.011	0.346	D
PN3	0.003	0.292	M
PU5	0.003	0.261	D
1432	0.005	0.378	M
9161	0.011	0.342	D
10646	0.008	0.339	D
10781	0.008	0.258	D
11019	0.008	0.221	D
11029	0.011	0.276	D
12230	0.008	0.379	D
14424	0.011	0.235	D
16445	0.013	0.308	D
S/N	0.011	0.255	D

Desvest: desviación estándar; DOm: densidad óptica promedio de la muestra; D: formadora de biopelícula débil; M: formadora de biopelícula moderada.

En la Figura 3 se muestran las DO de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en presencia de BaCl₂ (50 mM), observándose valores que oscilan, aproximadamente, entre 0.200 y 0.380, para las cepas PB16 y 12230, respectivamente.

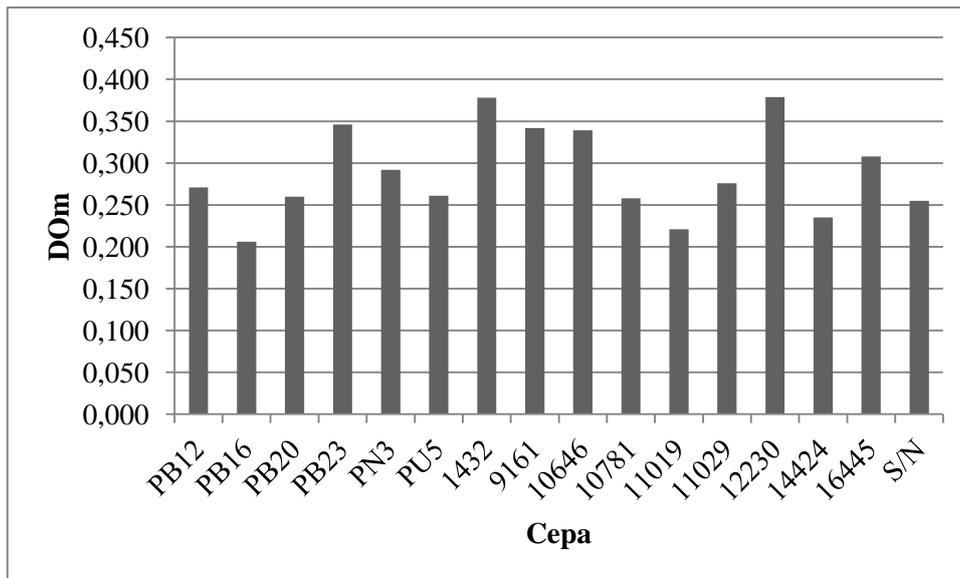


Figura 3. DO promedio de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en presencia de BaCl₂ (50 mM). DOm: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de *P. aeruginosa* aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.

En la Tabla VIII, se presentan los parámetros para la clasificación de los aislados, según su capacidad de formación de biopelículas, en presencia de BaCl₂ (100 mM). Ciertos valores no pudieron ser determinados por contaminación en los blancos.

Tabla VIII. Parámetros para la clasificación de las cepas, según su formación de biopelícula, en presencia de BaCl₂ (100 mM).

Cepa	Desvest	DOm	Clasificación
PB12	0.013	0.295	D
PB16	0.013	0.249	D
PB20	ND	ND	ND
PB23	ND	ND	ND
PN3	0.001	0.295	D
PU5	0.001	0.278	D
1432	0.009	0.420	M
9161	0.003	0.293	D
10646	0.000	0.386	D
10781	0.013	0.259	D
11019	0.013	0.222	D
11029	0.013	0.279	D
12230	0.000	0.391	D
14424	0.013	0.254	D
16445	0.012	0.313	D
S/N	0.003	0.310	D

Desvest: desviación estándar; DOm: densidad óptica promedio de la muestra; D: formadora de biopelícula débil; M: formadora de biopelícula moderada; ND: No determinado.

En la Figura 3 se muestran las DO de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en presencia de BaCl₂ (100 mM), observándose valores que oscilan, aproximadamente, entre 0.220 y 0.420, para las cepas 11019 y 1432, respectivamente.

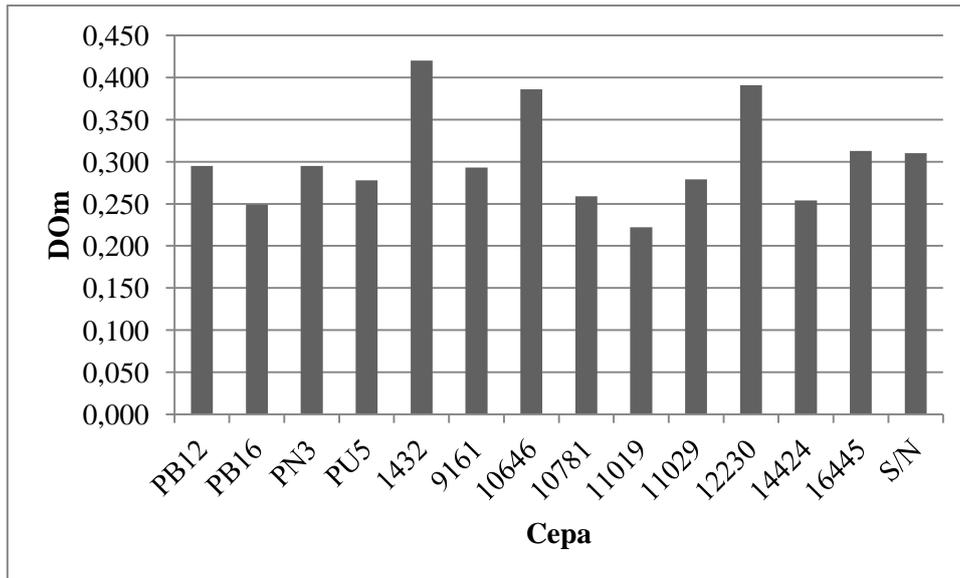


Figura 4. DO promedio de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en presencia de BaCl₂ (100 mM). DOm: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de *P. aeruginosa* aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.

En la Tabla IX, se presentan los parámetros para la clasificación de los aislados, según su capacidad de formación de biopelículas, en presencia de BaCl₂ (150 mM).

Tabla IX. Parámetros para la clasificación de las cepas, según su formación de biopelícula, en presencia de BaCl₂ (150 mM).

Cepa	Desvest	DOm	Clasificación
PB12	0.007	0.254	D
PB16	0.007	0.200	D
PB20	0.008	0.254	D
PB23	0.008	0.340	D
PN3	0.002	0.294	M
PU5	0.002	0.302	M
1432	0.004	0.428	M
9161	0.019	0.334	D
10646	0.008	0.379	D
10781	0.010	0.290	D
11019	0.010	0.235	D
11029	0.012	0.216	NF
12230	0.008	0.415	D
14424	0.012	0.233	D
16445	0.015	0.289	D
S/N	0.019	0.320	D

Desvest: desviación estándar; DOm: densidad óptica promedio de la muestra; D: formadora de biopelícula débil; M: formadora de biopelícula moderada; NF: no formadora de biopelícula.

En la Figura 4 se muestran las DO de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en presencia de BaCl₂ (150 mM), observándose valores que oscilan, aproximadamente, entre 0.200 y 0.430, para las cepas PB16 y 1432, respectivamente.

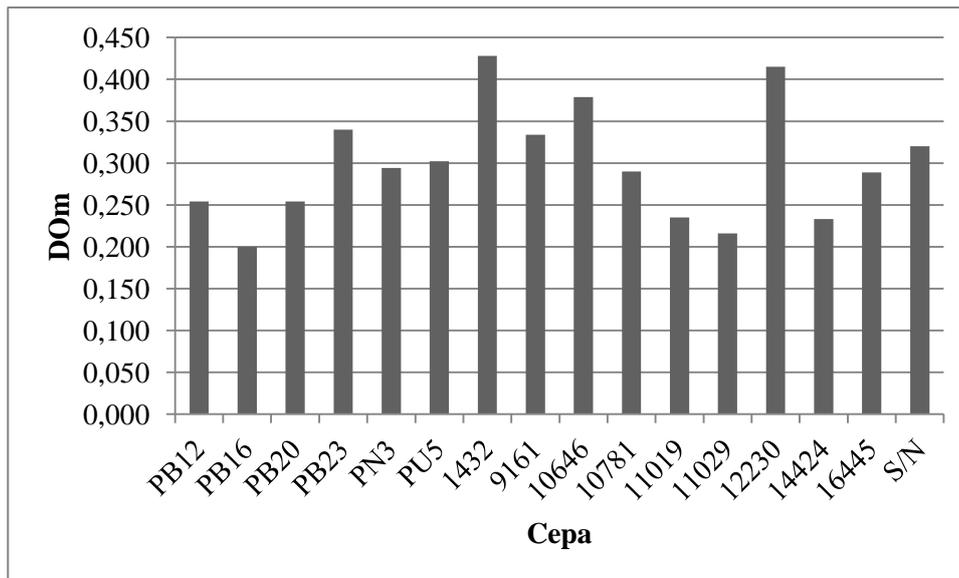


Figura 5. DO promedio de las cepas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en presencia de BaCl₂ (150 mM). DOm: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de *P. aeruginosa* aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.

En la Figura 6 se muestran las DO obtenidas para cada cepa estudiada, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, bajo todas las concentraciones de BaCl₂ ensayadas (0, 50, 100, 150 mM), observándose una variación representativa para la mayoría de las cepas. La clasificación de las cepas según su formación de biopelículas, se realizó con la comparación de los parámetros matemáticos expuestas en las Tablas VI – IX, reportándose en la Tabla X.

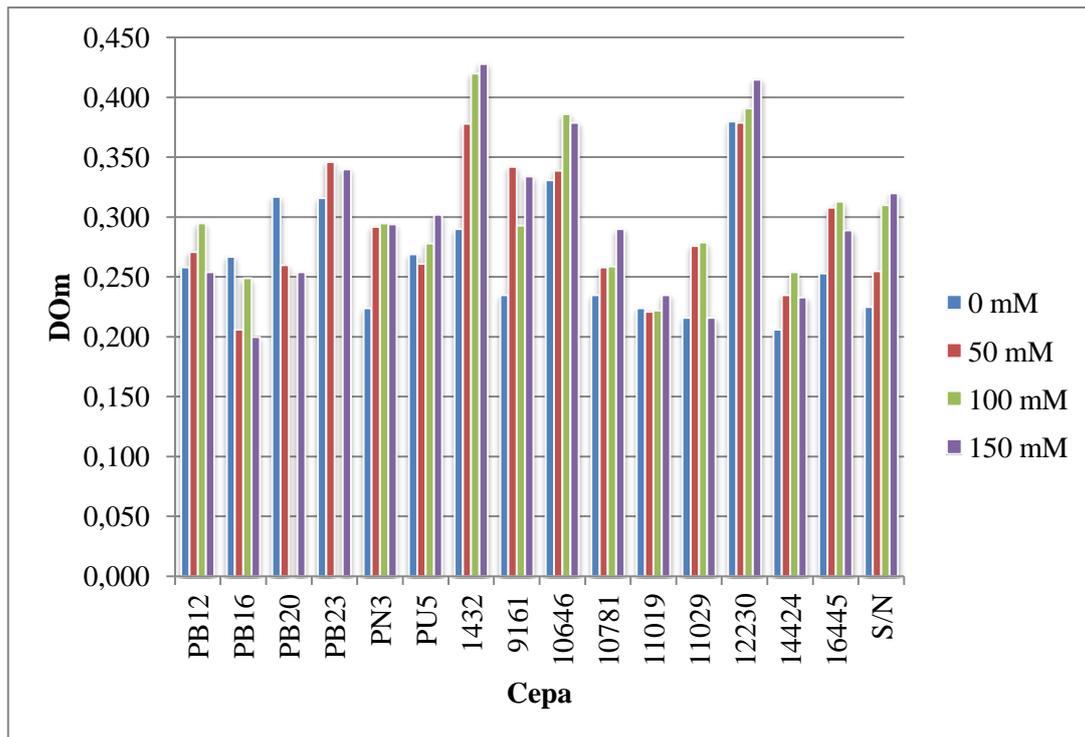


Figura 6. Variación de las DO promedio de las cepas en estudio, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, en ausencia y presencia de BaCl₂ (50, 100, 150 mM). DOm: densidad óptica promedio de la muestra; PB, PN, PU: muestras de *P. aeruginosa* aisladas del HUC; 9161, 10646, 10781, 11019, 11029, 12230, 14424, 16445, S/N: muestras de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con infecciones respiratorias

En la Tabla X se presenta la clasificación de los aislados de *P. aeruginosa*, provenientes del HUC y de infecciones respiratorias, según su capacidad de formación de biopelículas a concentraciones crecientes de BaCl₂. Todas las cepas fueron capaces de formar biopelículas en ausencia de BaCl₂; cinco de las cepas formaron biopelículas débiles (31 %), tres provenientes de muestras ambientales y dos de muestras clínicas; mientras que el resto de los aislados formaron biopelículas moderadas (69 %). De las dieciséis cepas estudiadas, once (69 %) fueron afectadas por la sal de bario a las concentraciones estudiadas (50, 100, 150 mM).

Tabla X. Clasificación de las cepas provenientes del HUC según su capacidad de formación de biopelículas a diversas concentraciones de BaCl₂.

Cepa	Concentración BaCl ₂ (mM)			
	0	50	100	150
PB12	D	D	D	D
PB16	D	D	D	D
PB20	M	D	ND	D
PB23	M	D	ND	D
PN3	D	M	D	M
PU5	M	D	D	M
1432	M	M	M	M
9161	M	D	D	D
10646	M	D	D	D
10781	M	D	D	D
11019	M	D	D	D
11029	D	D	D	NF
12230	M	D	D	D
14424	D	D	D	D
16445	M	D	D	D
S/N	M	D	D	D
J62-2	D	ND	ND	ND
MPAO1	M	ND	ND	ND

D: formadora de biopelícula débil; M: formadora de biopelícula moderada; NF: no formadora de biopelícula; ND: No determinado.

DISCUSIÓN

Corroboración de especie de las muestras en estudio

La prueba de Gram está corroborada por diversos autores, que ubican a *P. aeruginosa* como un bacilo gramnegativo. Los resultados obtenidos en la identificación de los aislados en este estudio, mediante pruebas bioquímicas, corresponden a lo registrado en los manuales e historiografía sobre identificación de especies microbianas, para *P. aeruginosa* en las siguientes pruebas: oxidasa, catalasa, agar hierro Kligler y citrato (MacFaddin, 2004).

Resistencia a diversos antibióticos

La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* son significativamente resistentes, incluso en la ausencia de plásmidos con al menos un gen de resistencia, a múltiples agentes antimicrobianos, incluyendo betalactámicos, TET, cloranfenicol; y fluoroquinolonas. Se ha asumido que este amplio rango de resistencia se debe a la baja permeabilidad de la membrana externa de *P. aeruginosa*, la presencia de bombas de eflujo a múltiples antibióticos y la inactivación endógena de los antimicrobianos, aunque han sido descubiertos y desarrollados nuevos agentes en contra de las *Pseudomonas*. *P. aeruginosa* fácilmente ha adquirido resistencia a antimicrobianos mediante mutaciones cromosomales y transferencia horizontal de los genes (Li, 1994; Morita, 2013).

La mayoría de las cepas estudiadas, así como los aislados investigados por Ndip y colaboradores en el 2005, fueron resistentes a la TET. La TET es un antibiótico bacteriostático, que entra en la bacteria mediante un proceso dependiente de energía y se une reversiblemente a la subunidad ribosomal 30S, previniendo la unión del aminoacil-

ARNt al aceptor ribosomal en el complejo ribosoma-ARN. *P. aeruginosa* posee una resistencia intrínseca a la TET mediante los sistemas de eflujo MexAB/MexYY (Ndip, 2005; Morita, 2013).

Gad y colaboradores en el 2008, reportaron que todos aislados estudiados presentaban resistencia a la AMX y AMP, asemejándose a lo obtenido en el presente estudio con las cepas ensayadas. Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de los antibióticos, destruyendo el sitio activo del antibiótico e impidiendo su actividad. *P. aeruginosa* posee dos clases de betalactamasas: AmpC, codificada en el DNA bacteriano; y betalactamasas de espectro extendido (BLEE), codificadas en plásmidos. Las AmpC tienen la capacidad de ser inducidas por los betalactámicos, principalmente AMP y AMX y se diferencian de las BLEE por ser resistentes a los inhibidores de betalactamasas (Gómez, 2005; Máttar, 2007; Gad, 2008).

Para los aminoglucósidos se obtuvieron resultados diferentes con respecto a la cantidad de cepas resistentes: para la AMK se obtuvo un mayor porcentaje de aislados resistentes comparado con lo registrado por la base de datos PROVENRA hasta el 2014, en 92279 cepas estudiadas, y por los datos obtenidos por Ndip en su estudio en el 2005 (Ndip, 2005; PROVENRA 2014). En el caso de la KAN los valores se asemejan con lo obtenido por Alemán y Guanche en el 2001, utilizando cepas de *P. aeruginosa* diferentes, ambas investigaciones con un alto porcentaje de cepas resistentes (Alemán, 2001).

La adquisición de genes de resistencia y enzimas modificadoras de aminoglucósidos (modificación del antibiótico, mayormente, por fosforilación) mediante la transferencia horizontal de genes son los responsables de la resistencia desarrollada por *P. aeruginosa*, con mayor probabilidad de mutaciones en los genes,

modificando los sitios activos de los antibióticos y desarrollando sistemas de eflujo (MexXY-OprM). También se han descubierto mecanismos de resistencia que involucran la metilación del sitio A del ARNr 16S de la subunidad 30S, interfiriendo con la unión del aminoglucósido (Poole, 2011).

Al igual que lo reportado por Amadi en el 2008, se encontraron múltiples aislados resistentes a la STR. La resistencia de *P. aeruginosa* a la STR puede darse por diversos mecanismos dentro de los cuales se encuentra el factor R, que media la inactivación del antibiótico mediante la fosforilación de los ribosomas o disminución de la permeabilidad en la pared celular (Amadi, 2008; Tseng, 1972).

Son pocas las opciones que quedan para el efectivo tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes como *P. aeruginosa*. Entre los antibióticos con alta eficacia contra *P. aeruginosa* se encuentran MEM e IPM, según lo reportado por Gómez en el 2005, coincidiendo con lo obtenido en el presente estudio. El sistema de bomba de eflujo más común involucrado en la resistencia de *P. aeruginosa* a carbapenems es el MexAB-OprM, consiste de una bomba MexB, una lipoproteína de unión MexA y una portal de salida Opr. Los carbapenems entran en el espacio plasmático de *P. aeruginosa* a través de la porina OprD. Por medio de una mutación de la porina se genera la resistencia a IPM y se reduce la susceptibilidad a MEM (Gómez, 2005; Meletis, 2012).

Chalbaud, en el año 2010, evaluó la resistencia de muestras de *P. aeruginosa*, provenientes del HUC, a diversos antibióticos. Entre los fenotipos reportados de las muestras utilizadas en el presente estudio (PB1, PB4, PB13, PB16, PB17, PB20, PB25, PB26, PN3, PN5, PN20, PU5), obtuvo seis de las doce cepas resistentes a IMP (50 %), cuatro aislados resistentes a MEM (33 %), tres cepas resistentes a AMK (25 %) y todos los aislados resistentes a STR (100 %) (Chalbaud, 2010).

En el caso de la STR, coincide el porcentaje de cepas resistentes (100 %) tanto para las muestras ambientales como para las muestras clínicas de *P. aeruginosa*. Sin embargo, en los antibióticos restantes la cantidad de cepas resistentes varía notablemente; para la AMK se obtuvo que un 25 % de las muestras provenientes del HUC son resistentes al antibiótico, mientras que un 60 % de los aislados de infecciones respiratorias no se vieron afectados por el antimicrobiano. En el caso del IMP, se obtuvo una mayor cantidad de cepas resistentes en las muestras ambientales (50 %) en comparación con las muestras clínicas (20 %). Para el MEM se obtuvo que el 33 % de los aislados provenientes del HUC no se vieron afectados al antibiótico, mientras que solo el 20 % de los aislados tomados de infecciones respiratorias fueron resistentes al antimicrobiano (*Chalbaud, 2010*). Estos resultados evidencian que dependiendo del ambiente donde se desarrolle el microorganismo, los procesos regulatorios pueden variar, incluso siendo la misma especie.

Como se evidenció, son escasos los antibióticos que aún poseen una actividad bactericida efectiva contra patógenos de importancia clínica, como *P. aeruginosa*, por la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia que le permiten a la bacteria adaptarse a su ambiente, comprometiendo la salud humana. Es por esto, que se evaluó la resistencia a BaCl_2 , como introducción a una técnica alternativa para el tratamiento de dicho patógeno oportunista.

Efecto del BaCl_2 sobre células en crecimiento libre

La concentración mínima inhibitoria se define como la mínima concentración de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Dentro de las concentraciones de BaCl_2 ensayadas, no se logró obtener el valor de la MIC, sin embargo se pudo acotar que la misma se encuentra en un rango menor a 5 mM para las

cepas de *P. aeruginosa* provenientes del HUC y de infecciones respiratorias, en crecimiento libre. Tomando en cuenta estos resultados y la capacidad de *P. aeruginosa* de formar biopelículas como mecanismo ante condiciones adversas, se seleccionaron tres concentraciones (50, 100, 150 mM), partiendo de la máxima concentración de BaCl₂ estudiada, para evaluar el efecto del BaCl₂ en los aislados de *P. aeruginosa* provenientes de infecciones respiratorias.

Sivolodskii en el 2012, evaluó la sensibilidad de *Pseudomonas* spp a iones de bario, suplementando el medio con BaCl₂ previo a la inoculación. Las cepas fueron sembradas en un medio nutritivo sintético que promueve el crecimiento de todas las cepas de *Pseudomonas* y asegura una escasa unión de los iones de bario a los componentes del agar, obteniendo una MIC entre 0,5 y 6 g/L (0,5 - 6 mM) (Sivolodskii, 2012). Teitzel y colaboradores en el año 2003, reportaron valores de MIC para tres metales pesados: cobre, zinc y plomo, obteniendo concentraciones de 2, 8 y 0.125 mM respectivamente (Teitzel y Parsek, 2003).

Diversas bacterias son capaces de incorporar ciertos metales pesados, como el bario, en su interior celular, debido a que presentan una estructura similar a otros compuestos esenciales en el metabolismo bacteriano. La cepa control, J62-2 (*E. coli*) fue capaz de crecer a todas las concentraciones de BaCl₂ estudiadas (5, 10, 15, 20, 15, 50 mM), lo cual concuerda con lo obtenido por Bazdikian en el año 2013, sugiriendo que el bario puede ser utilizado por aislados de *E. coli*, sustituyendo algún otro elemento divalente que presente sitios de unión similares, y por tanto, cumpliendo con alguna actividad metabólica del microorganismo (Bazdikian, 2013).

Con los resultados descritos en la presente investigación, y en trabajos previos, se demuestra que para el uso de metales pesados, en condiciones de crecimiento libre, se requiere una baja concentración del mismo, siendo una alternativa con alto rendimiento

tanto a nivel industrial, para la formulación de un producto a base de Ba partiendo de bajas concentraciones del mismo, como a nivel clínico, brindando la posible erradicación, en el área clínica, de ciertos patógenos nosocomiales oportunistas, como *P. aeruginosa*, que afectan la calidad de vida de los pacientes infectados.

Efecto del BaCl₂ sobre biopelículas

La mayoría de las cepas estudiadas, provenientes del HUC y de infecciones respiratorias, fueron capaces de formar biopelículas moderadas (69 %), y alguna de formar biopelículas débiles (31 %). El 69 % de los aislados presentaron sensibilidad a las concentraciones de BaCl₂ estudiadas (50, 100, 150 mM), correspondiendo un 63 % a cepas clasificadas como formadoras de biopelículas moderadas en ausencia de BaCl₂, y formadoras de biopelículas débiles bajo las concentraciones de BaCl₂ estudiadas; el 6 % restante, compete a los aislados clasificados como formadores de biopelículas débiles en ausencia de BaCl₂, y no formadores de biopelículas a la mayor concentración de BaCl₂ estudiada (150 mM).

Teitzel y Parsek en el 2003, reportaron el gradiente de viabilidad celular en biopelículas de *P. aeruginosa*, en medio nutritivo y con tratamientos de cobre y zinc. Al proveerle todos los nutrientes a los microorganismos, observaron una heterogeneidad estructural. Al agregar las soluciones de los metales pesados, obtuvieron que las células de las capas externas de la biopelícula murieron, mientras que las bacterias que se encontraban más cerca del sustrato no fueron afectadas por los metales pesados estudiados. Una posible explicación es la exposición de las células en las capas superiores a mayores concentraciones de los antimicrobianos. Ambos resultados sugieren que la formación de biopelículas representa un mecanismo de resistencia diferente al de las células en crecimiento libre (Teitzel y Parsek, 2003).

Tanto los exopolisacáridos como las células de la capa externa, pueden secuestrar cationes divalentes, mediante uniones o proteínas de membrana, respectivamente. Los principales exopolisacáridos producidos por *P. aeruginosa* son alginato, Psl y Pel. Ghafoor y colaboradores en el 2011, demostraron la importancia de estos exopolisacáridos mediante el estudio de cepas mutantes, demostrando que el alginato está involucrado en la viabilidad celular en las biopelículas, Pel interviene en la densidad celular y/o la compactación de la estructura de la biopelícula y Psl está involucrado en la adherencia (Teitzel y Parsek, 2003; Ghafoor, 2011). Chien y colaboradores en el 2013, reportaron también la participación de los exopolisacáridos en la resistencia a los metales pesados. Evaluando la formación de biopelículas de *Pseudomonas* spp ante iones de cadmio, obtuvieron una producción mayor (50 %) de exopolisacáridos, comparada con aquellas creciendo en medios sin metales pesados (Chien, 2013).

Meliani y Bensoltane, en el 2016, reportaron la resistencia de cepas de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, creciendo en biopelículas, al plomo y el zinc. Todas las cepas fueron capaces de producir biopelículas que variaban según su espesor en presencia de los metales estudiados. Resaltan la firmeza de la biopelícula bajo condiciones de estrés y su potencial de mantener un nicho favorable en presencia de metales pesados, sin embargo, estadísticamente, la formación de biopelículas se relacionó más con la resistencia a antibióticos que a metales pesados (Meliani y Bensoltane, 2016), reafirmando el uso de este tipo de compuestos como una nueva alternativa para combatir patógenos del área clínica, como *P. aeruginosa*.

En diversas investigaciones se ha reportado que en presencia de metales pesados, la producción de exopolisacáridos aumenta, sugiriendo que estos compuestos están involucrados en la retención de metales pesados en la matriz; bajo este principio

se han utilizados procesos de biorremediación, tecnología que permite la remoción de sustancias tóxicas en el ambiente mediante el uso de microorganismos. Por otra parte, en las biopelículas, los microorganismos presentan diversas fases de crecimiento, y dependiendo de dicho estado, el microorganismo puede ser más o menos susceptible a diversos antimicrobianos (*White y Gadd, 2000; Donlan y Costerton, 2002; Meliani y Bensoltane, 2016*).

Tomando en cuenta ambos fundamentos, puede sugerirse que dependiendo de la concentración del metal pesado a la que las bacterias se encuentren, varía su comportamiento, mediante la retención del metal o bajo susceptibilidad al mismo, lo que explicaría el comportamiento de las cepas ambientales, PN3 y PU5, bajo las condiciones ensayadas formando biopelículas

Comparando las muestras estudiadas, su procedencia y su sensibilidad al BaCl₂, bajo las condiciones estudiadas, formando biopelículas, se obtuvo que las cepas procedentes de pacientes con infecciones respiratorias (69 %) presentaron mayor sensibilidad que las cepas provenientes de ambiente (0 %), lo que da un indicio de que el BaCl₂ puede ser utilizado con mayor eficacia en tratamientos aplicados a pacientes, para disminuir una infección causada por *P. aeruginosa*, que en la limpieza de áreas físicas.

Biopelículas en interfase aire-líquido

Autores como Spiers y colaboradores, y Koza y colaboradores, en los años 2003 y 2009, respectivamente, reportaron la formación de biopelículas de *Pseudomonas fluorescens* en la interfase aire-líquido de microambientes estáticos gracias a la sobreproducción de polímeros celulósicos (productos de la modificación de la molécula de celulosa), codificados por el operón *wss*. Metales como el hierro, cobre, plomo o

magnesio, son capaces de inducir la formación de este tipo de biopelículas, aumentando la viscosidad de la misma con el incremento en la concentración de los metales, pero disminuyendo la adhesión a la superficie. En el caso de las biopelículas ya formadas, el hierro disminuyó notablemente la rigidez de las mismas (Spiers, 2003; Koza, 2009).

Los resultados de las investigaciones previas demuestran que los metales pesados pueden ser una alternativa para contrarrestar la resistencia intrínseca, y adquirida, de *P. aeruginosa* ante la presión selectiva que generan los antibióticos, siendo el bario una nueva opción de estudio que podría traer grandes beneficios en el área clínica.

La producción de biopelículas en interfase aire-líquido, demuestra la amplia capacidad de adaptación que presentan las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, existiendo la posibilidad que, en este estudio, parte de las biopelículas formadas, hayan sido retiradas o modificadas mediante el procedimiento de recambio de medio, por lo que se exhorta como ensayo complementario, evaluar la ausencia o presencia de este tipo de biopelículas en las cepas estudiadas.

Con los resultados presentados, donde se obtuvo que solo dos de los ocho antibióticos estudiados (IMP, MEM) obtuvieron un bajo porcentaje de cepas resistentes (20 %), se evidencia la disminución en la cantidad de antibióticos efectivos en el tratamiento de *P. aeruginosa*, por lo que es importante el estudio de compuestos que sirvan de alternativas, como podría ser el BaCl₂, para disminuir o erradicar a este patógeno nosocomial.

El BaCl₂ inhibió el desarrollo de las bacterias en crecimiento libre, en fase exponencial, tanto de las muestras tomadas en el HUC como de las muestras provenientes de infecciones respiratorias, a las concentraciones estudiadas (5, 10, 15, 20, 50 mM), y afectó las biopelículas formadas en el 69 % de los aislados. De este

porcentaje, el 63 % correspondió a cepas clasificadas como formadoras de biopelículas moderadas en ausencia de BaCl₂, y formadoras de biopelículas débiles bajo las concentraciones de BaCl₂ estudiadas (50, 100, 150 mM); el 6 % restante, compete a los aislados clasificados como formadores de biopelículas débiles en ausencia de BaCl₂, y no formadores de biopelículas a la mayor concentración de BaCl₂ estudiada (150 mM), lo que sugiere que este compuesto podría ser utilizado en el proceso de desinfección de áreas críticas de clínicas, hospitales y centros asistenciales, como quirófanos, habitaciones, UTI, áreas de emergencia, como alternativas a otros productos, utilizados en la actualidad, para disminuir la actividad contaminante de *P. aeruginosa*, considerado uno de los principales patógenos nosocomiales oportunistas que afecta gravemente la salud humana, y así poder brindar una mejor calidad de vida a los pacientes vulnerables de ser colonizados por esta bacteria.

Es importante resaltar que se deben ampliar los estudios en esta área para obtener resultados que puedan ayudar a disminuir las graves consecuencias de las infecciones producidas por uno de los principales patógenos oportunistas multirresistentes a los antibióticos actuales, como es *P. aeruginosa*, y así poder brindar una mejor calidad de vida a todos aquellos pacientes que sean susceptibles a adquirir esta bacteria, o que ya presenten una infección por parte de la misma.

CONCLUSIONES

- De los antibióticos estudiados, solo los carbapenems (IMP, MEM) poseen efecto antimicrobiano favorable, en el 80 % de las muestras provenientes de infecciones respiratorias.
- El cloruro de bario, a las concentraciones estudiadas (5, 10, 15, 20, 50 mM), inhibe el desarrollo de células en crecimiento libre, en el 100 % de las muestras provenientes del HUC e infecciones respiratorias.
- Todas las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas, provenientes del HUC e infecciones respiratorias, son capaces de formar biopelículas débiles (31 %) o moderadas (69 %), bajo las condiciones ensayadas.
- El cloruro de bario, a las concentraciones estudiadas (50, 100, 150 mM), afecta el 69 % de las biopelículas formadas, con un 63 % de cepas clasificadas como formadoras de biopelículas moderadas y formadoras de biopelículas débiles, y un 3 % como formadoras de biopelículas débiles, y no formadoras de biopelículas, en ausencia y presencia de bario, respectivamente.
- Los resultados obtenidos permiten sugerir el uso del BaCl₂ en procesos de desinfección, principalmente en pacientes.

RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta la grave problemática clínica presentada a lo largo del trabajo, es importante destacar como principal recomendación, la concientización en el uso razonable de las diversas sustancias antimicrobianas utilizadas en la actualidad, antibióticos y desinfectantes clínicos, y todos aquellos compuestos bactericidas que puedan surgir en el futuro de esta o cualquier otra investigación.

En caso de continuar esta línea de investigación, se recomienda ampliar la procedencia de las muestras clínicas, referente a la localización de la infección. También, evaluar la formación de biopelículas con diferentes parámetros (temperatura y tiempo de incubación, medio de cultivo utilizado y recambio del mismo, superficie de crecimiento, entre otros), considerando que la misma se da en mayor proporción bajo condiciones de estrés.

La disponibilidad de antibióticos ha ido disminuyendo notablemente con el paso de los años, por lo que se exhorta a la realización de estudios que permitan la creación de nuevos antimicrobianos con actividad efectiva y la concientización en el uso racional de los mismos, siempre en pro de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

ANEXO.

Carta de aprobación de protocolo por parte del Comité de Bioética de la Clínica El Ávila.

**Comite de Bioetica**
Clinica El Avila

APROBACION DE PROTOCOLO

Fecha: 03 de julio de 2017

Nº: de Protocolo: **026CBCEA072017**

Laboratorio o Patrocinante: Universidad central de Venezuela

No. de Revisión: 01

Responsable: Br. Mónica Quijada

Título del Protocolo: "DETERMINACION DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA A CLORURO DE BARIO EN AISLADOS DE Pseudomonas aeruginosa, CRECIENDO EN BIOPELICULAS, PROVENIENTES DE INFECCIONES RESPIRATORIAS"

Droga: NO APLICA

Institución y/o Laboratorio: CLINICA EL AVILA.

Documentos entregados y evaluados:

- Protocolo de Estudio Clínico Versión 1.0. Original en Español de Fecha 30 de junio de 2017.

La Junta Directiva del CBCEA ha revisado su protocolo y ha emitido el siguiente dictamen:

• APROBADO

A los seis meses de aprobado el Protocolo se enviara el formato para seguimiento del trabajo y posteriormente hasta el final del estudio.


Dr. David Martín
Presidente
C.I. No.5.539.413



ASOC. MED. SANT. SALC. BAST

BIBLIOGRAFÍA

- Alemán, L., Guanche, H. 2001. Etiología de la infección del sitio quirúrgico en pacientes egresados del hospital clinicoquirúrgico docente “Joaquín Albarrán” enero a marzo del 2000. *Rev Cubana Cir.* **40(4)**: 291-6
- Amadi, E., Uzoaru, P., Orji, I., Nwaziri, A., Iroha, I. 2008. Antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Enugu and Abakaliki, Nigeria. *The Int Jou of Infect Disea.* **7(1)**
- Andrews, J. 2005. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* **48(1)**: 5-16
- Angril, J., Agusti, C., de Celis, R., Rañó, A., Gonzalez, J., Solé, T., Xauber, A. y colaboradores. 2002. Bacterial colonization in patients with bronchiectasis: Microbiological pattern and risk factors. *Thorax.* **57**: 15-19
- Aninwene, G., Stout, D., Yang, Z., Webster, T. 2013. Nano-BaSO₄: A novel antimicrobial additive to pellethane. *Int. Journ. Nanomed.* **8**: 1197-1205
- Banin, E., Brady, K., Greenberg, P. 2005. Chelator-Induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **72(3)**: 2064-2069
- Bazdikian, E. 2013. Prevalencia y trasmisibilidad de determinantes de resistencia a metales pesados en *Escherichia coli* aislada de pacientes con infecciones en el tracto urinario. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

- Bouvet, E. 1993. Risk for health professionals of infection with human immunodeficiency virus. Current knowledge and developments in preventive measures. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **23**: 28– 33
- Cantón, R., Gómez, E., Fernández-Olmos, A. 2009. Aspectos microbiológicos de las bronquiectasias. El problema de la *Pseudomonas aeruginosa*. [En línea]. [citado 03 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.neumologiaysalud.es/descargas/M1/M1-4.pdf>
- Carvalho, C., Naziozeno, Y., Roberto, L., Dutra, M. 2005. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **100(5)**: 541 - 548
- Cervantes, C., Espino-Saldaña, A., Acevedo-Aguilar, F., León, I., Rivera-Cano, M., Avila-Rodríguez, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **48(2)**: 203-210
- Chalbaud, A. 2010. Caracterización epidemiológica de bacterias causantes de infecciones nosocomiales. Tesis doctoral, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.
- Chien, C., Lin, B., Wu, C. 2013. Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. *Biochemical Engineering Journal* **78**: 132-137
- Donlan, R. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **8(9)**: 881–890
- Donlan, R., Costerton, W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15(2)**: 167-193
- Fergusson, J. 1990. The heavy elements. Chemistry, environmental impact and health effects. *Pergamon Press*. Michigan, USA

- Fung, C., Apun, K., Jala, J., Bilung, L., Su'ut, L., Fatma, H. 2017. Microtitre plate assay for the quantification of biofilm formation by pathogenic *Leptospira*. *Res. J. Microbiol.* **12(2)**: 146-153
- Gad, G., Domany, R., Ashour, H. 2008. Antimicrobial susceptibility profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Egypt. *J Urol.* **180(1)**: 176-81
- Ghafoor, A., Hay, I., Rehm, B. 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol.* **77(15)**: 5238-5246
- Giller, P., Malmqvist, B. 1998. The biology of streams and rivers. *Oxford University Press, New York*
- Gómez, C., Leal, A., Pérez, M., Navarrete, M. 2005. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*. [En línea]. [citado 06 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v53n1/v53n1a04.pdf>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews.* **2**: 94-108
- Hancock, R., Brinkman, F. 2002. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol.* **56**: 17–38
- Hobman, J., Crossman, L. 2014. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *Journal of Medical Microbiology.* **64**: 471 - 497
- Klebensberger, J., Birkenmaier, A., Geffers, R., Kjelleberg, S., Philipp, B. 2009. SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* **11**: 3073–3086

- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S. 2013. Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **3**: 1-23
- Koza, A., Hallett, P., Moon, C., Spiers, A. 2009. Characterization of a novel air-liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Microbiology.* **155**: 1397 – 1406
- Lenntech. Bario - Ba. 2017 [En línea]. [citado 03 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/ba.htm>
- Li, X., Livermore, D., Nikaido, H. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chem.* **38(8)**: 1732-1741
- Lima, A., de Carvalho, M., de Souza, S., Dias, P., da Silva, R., Meirelles, C., Hofer, E. 2012. Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology.* **43(4)**: 1620–1631
- Lloria, M. 2009. Manejo de las infecciones por organismos multirresistentes. [En línea]. [citado 03 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.sati.org.ar/files/infectologia/2009-Infecciones-por-P-aeruginosa-en-UTI-%20Revision.pdf>
- Madigan, M., Martink, J., Dunlap, P., Clark, D. 2002. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson. Décimo segunda edición. Madrid, España
- Manson, J., Hancock, L., Gilmore, M. 2010. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107(27)**: 74–12269

- McFaddin, J. 2004. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana
- Meletis, G., Exindari, M., Vavatsi, N., Sofianou, D., Diza, E. 2012. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia*. **16(4)**: 303-307
- Meliani, A., Bensoltane, A. 2016. Biofilm-mediated heavy metals bioremediation in PGPR *Pseudomonas*. *J Bioremediat Biodegrad*. **7**: 370
- Morita, Y., Tomida, J., Kawamura, Y. 2013. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol*. **4**: 422
- Munita, J., Arias, C. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*. **4(2)**
- Navarro-Abiño, J., Aguilar, A., López-Moya, J. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Rev. Ecosistemas* **16 (2)**: 10-25
- Nazar, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol*. **67**: 61-72
- Ndip, R., Dilonga, H., Ndip, L., Akoachere, .F, Nkuo, T. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from clinical and environmental samples in Buea, Cameroon: current status on biotyping and antibiogram. *Trop Med Int Health*. **10(1)**: 74-81
- Obritsh, M., Fish, D., MacLaren, R., Jung, R. 2005. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*. **25**
- Oliveira, A., Pampulha, M. 2006. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *J Biosci Bioeng*. **102**: 157–161

- OMS: Organización Mundial de la Salud. 2001. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. [En línea]. [citado 01 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf?ua=1>
- OMS: Organización Mundial de la Salud. 2002. Prevención de las infecciones nosocomiales. Segunda Edición. Genève, Suiza
- OMS: Organización Mundial de la Salud. 2006. Guías para la calidad del agua potable. Tercera Edición. Genève, Suiza
- OMS: Organización Mundial de la Salud. 2017 La OMS publica la lista de bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [En línea]. [citado 01 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
- Pages, J., James, C., Winterhalter, M. 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* **6(12)**: 893–903
- Parsek, M., Singh, P. 2003. Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 677–701
- Passerini, B., Calenda, M., Vay, C., Franco, M. 2007. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from device-associated nosocomial infections *Rev. Arg. Microb.* **39(4)**: 204-212
- Pérez, M., Alvarado, J., Acosta, L., Bastidas, Y., García, A. Arrieta, N., Lucich, A. 2015. Bacterias formadoras de biofilm en tejido adenoideo en infecciones del tracto respiratorio superior. *Rev. Act. Otorrinolar.* **28(3)**: 34-47

- Polanco, N., Moronta, R., O'Daly, J. 2006. Variabilidad en los exoproductos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de diferentes muestras clínicas. *Vit. Acad. Biom. Dig.* **27**
- Poole, K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* **56(1)**: 20–51
- Poole, K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front in Microb.* **65: 2**
- Poole, K., Gadd, G. 1989. Metals: microbe interactions. *IRL Press, Oxford.* 1–37
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 2002. Microbiología. McGraw Hill. Quinta edición. Navarra, España
- PROVENRA. 2014. Gráficos y reportes. [En línea]. [citado 04 de enero de 2018]. Disponible en: <http://provenra.plattinux.com/graficos-reportes>
- Ramos, Y. 2014. Caracterización fenotípica, funcional y molecular de la resistencia a desinfectantes expresados por aislados de *A. baumannii* y *S. maltophilia*. Estudio en células libres y en biopelículas. Tesis doctoral, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Sanabria, Z. 2015. Estudio del fenotipo y la trasmisibilidad de la resistencia a vanadio en aislados de *Klebsiella pneumoniae*. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Sánchez, D., Maggi, G., Ugarte, C., Payares, D., León, L., Spadola, E., Marcano, D. 2008. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales de Venezuela. *Rev. Inst. Nac. Hig.* **39(2)**: 17-22

- Seija, V., Vignoli, R. 2008. Principales grupos de antibióticos. [En línea]. [citado 05 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>
- Sivolodskii, E. 2012. Determination of the sensitivity of bacteria to barium ions, a taxonomic marker of the genus *Pseudomonas*. *Microbiology*. **81(1)**: 112–117
- Smith, D., Nehring, S. 2017. Bacteremia. [En línea]. [citado 13 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441979/>
- Spiers, A., Bohannon, J., Gehrig, S., Rainey, P. 2003. Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*. **50(1)**: 15 – 27
- Tchounwou, P., Yedjou, C., Patlolla, A., Sutton D. 2012. Heavy metals toxicity and the environment. *EXS*. **101**: 133–164
- Teitzel, G., Parsek, M. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69(4)**: 2313-2320
- Thomas, C., Nielsen, K. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol.* **3(9)**: 21–711
- Tseng, J., Bryan, L., Van den Elzen, H. 1972. Mechanisms and spectrum of streptomycin resistance in a natural population of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2(3)**: 136-41
- Vallet, I., Olson, J., Lory, S., Lazdunski, A., Filloux, A. 2001. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci.* **98**: 6911–6916

- Vázquez, C., Martín, A., de Silóniz, M. I., & Serrano, S. 2011. Técnicas básicas de microbiología. Observación de bacterias. *REDUCA (Biología)*. **3(5)**
- Ventola, C. 2015. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*. **40(4)**: 277–283.
- Wang, Y., Shi, J., Wang, H., Chen, O., Chen, Y. 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotox Environ Safat*. **67**: 75–81
- Whitchurch, C., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P., Mattick, J. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. **295**: 1487
- White, C., Gadd, G. 2000. Copper accumulation by sulfate-reducing bacterial biofilms. *FEMS Microbiol Lett*. **183**: 313-318
- Yayan, J., Ghebremedhin, B., Rasche, K. 2015. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-year period. *PLoSONE*. **10(10)**
- Yum, H., Park, I., Shin, B., Choi, S. 2014. Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic lung diseases: relapse or reinfection? *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. **77(4)**: 172–177
- Zampieri, B., Pinto, A., Schultz, L., de Oliveira, M., de Oliveira, A. 2016. Diversity and distribution of heavy metal-resistant bacteria in polluted sediments of the Araça Bay, São Sebastião (SP), and the relationship between heavy metals and organic matter concentrations. *Microb Ecol*. **72(3)**: 582–94