

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA BÁSICA Y APLICADA**



**“INFLUENCIA DE LA N-ACETILCISTEÍNA EN LA PREVENCIÓN
DE LA FORMACIÓN Y REMOCIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS DE
Pseudomonas aeruginosa”**

**TESIS
para optar el Título Profesional de
Químico farmacéutica**

**AUTORA
Rossana Cristobal Damas**

**ASESORA
Mirtha Roque Alcarraz**

**Lima-Peru
2007**

DEDICATORIA

A Dios, que siempre me ha acompañado y cuidado a lo largo de mi vida, a mi papá por todo el amor que me brindo, a mi mamá Justina por su amor infinito, por su fuerza para salir adelante y su dedicación completa hacia mi hermano y hacia mí.

A mi hermano Alvaro que siempre ha sido un ejemplo de persona para mí y me ha enseñado a superar los problemas por más difíciles que fueran, a mi abuelito Nicanor por su cariño y paciencia, a mis tíos por su confianza y apoyo constante, a mis primos que siempre estuvieron apoyándome.

A mis asesoras por su paciencia y comprensión, y por cada instante que me dedicaron, a todos mis profesores que me apoyaron durante toda la etapa universitaria y me ayudaron a formarme personal y profesionalmente.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Elba Linares Jefa del departamento de Microbiología del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, por brindarme su apoyo incondicional para la realización del presente trabajo de investigación.

A la Gerencia Médica de la Red asistencial Rebagliati y a los miembros del Consejo de Investigación de la Oficina de Capacitación, Docencia e Investigación por haber hecho posible la ejecución de mi investigación.

A los doctores Gerardo Gamarra, José Irey, Mirtha Roque, Maria Elena Salazar y Julio Ruiz del Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiológica y Biotecnológica "Marco Antonio Garrido Malo" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por todas las facilidades que me brindaron durante el desarrollo de la investigación realizada.

A mi asesora y a mi co-asesora un especial agradecimiento por todo el tiempo invertido y los consejos brindados, gracias a los cuales se terminó el desarrollo del presente trabajo.

A los distinguidos Miembros del Jurado que con sus observaciones y sugerencias ayudaron a culminar la elaboración del presente trabajo.

A mi amiga Angela y a todos mis amigos que de alguna manera me apoyaron durante la ejecución de la investigación realizada.

INDICE

RESUMEN

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

I.- GENERALIDADES

1. BIOPELÍCULAS – BACTERIAS EN COMUNIDADES

1.1.- DEFINICIÓN	15
1.2.- ORIGEN DE LAS BIOPELÍCULAS	15
1.3.- ESTRUCTURA DE LAS BIOPELÍCULAS	
1.3.1.- Masa Celular.-	17
1.3.2.- Espacios Intercelulares o Canales	17
1.3.3.- Matriz Extracelular	17
1.4.- FASES DE DESARROLLO DE LAS BIOPELÍCULAS	
1.4.1.- Acondicionamiento de la Superficie	19
1.4.2.- Adherencia Bacteriana	20
1.4.3.- Maduración: Matriz Extracelular	22
1.4.4.- Cooperación entre Especies.-	22
1.4.5.- Crecimiento y Dispersión.-	22
1.5.- PROPIEDADES DE LAS BIOPELÍCULAS	
1.5.1.- Heterogeneidad Fisiológica	23
1.5.2.- Fenotipos en las Biopelículas	23
1.5.3.- Señales en las Biopelículas	23
1.5.4.- Capacidad Adaptativa	24

1.6.- RESISTENCIA DE LAS BIOPELÍCULAS	
1.6.1.- Penetración Restringida y Degradación de Antibióticos	25
1.6.2.- Baja tasa de Crecimiento	25
1.6.3.- Cambios Fenotípicos	26
1.6.4.- Persistencia y Tolerancia Bacteriana	26
1.7.- BIOPELÍCULAS EN EL MEDIO AMBIENTE	
1.7.1.- Biopelículas en la Industria	27
1.7.2.- Biopelículas y Enfermedades	27
2.- GÉNERO <i>Pseudomonas</i>	
2.1.- DEFINICIÓN	30
2.2.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
2.2.1.- Variabilidad Genética	31
2.2.2.- Plásmidos	33
2.2.3.- “Quórum sensing”	33
2.2.4.- Formación de Biopelículas	34
2.2.5.- Motilidad	35
2.3.- INDUSTRIAS Y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
2.4.- CAMPO HOSPITALARIO Y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
2.5.- RESISTENCIA NATURAL A ANTIBIÓTICOS	37
3.- N-ACETILCISTEÌNA	38
II.- PARTE EXPERIMENTAL	
1.- MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	39
2.- MATERIAL BIOLÓGICO	41
	41
	41

3.- METODOLOGÍA DE TRABAJO

3.1.- RECOLECCION DE MUESTRAS

3.2.- IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *Pseudomonas aeruginosa*

3.3.- SELECCION DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS

3.4.- SELECCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE MAYOR CANTIDAD DE BIOPELÍCULAS

3.5.- INFLUENCIA DE N-ACETILCISTEINA EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa in vitro*.

3.6.- INFLUENCIA DE N-ACETILCISTEINA EN LA REMOCIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa in vitro*.

III.- RESULTADOS

IV.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

V.- CONCLUSIONES

VI.- RECOMENDACIONES

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VIII.- GLOSARIO

IX.- ANEXOS

ABREVIATURAS

- SUSTANCIA EXOPOLIMÉRICA EXTRACELULAR (EPS)
- CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (MIC)
- BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS (BSR)
- UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS (UCI)
- ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO (EDTA)
- AGAR ROJO DE CONGO (ARC)
- N-ACETILCISTEÍNA (NAC)
- AGAR TRIPTICASA DE SOYA (TSA)
- AGAR HIERRO DE KLIGLER (KIA)
- CALDO TRIPTICASA DE SOYA (TSB)
- TEMPERATURA AMBIENTE (TA)
- SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA (SSF)

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa, es uno de los más importantes patógenos humanos oportunistas, que puede colonizar no solo superficies abióticas, sino también superficies bióticas. Una vez colonizadas estas superficies, dicha bacteria produce exopolisacárido originando la formación de biopelículas, en consecuencia, estas bacterias son mil veces más resistentes, no sólo a antibióticos, sino también a biocidas y desinfectantes, constituyendo un problema de salud pública.

Actualmente se están realizando estudios para poder controlar la formación de biopelículas con la aplicación de diferentes sustancias, es así que se ha demostrado la influencia negativa de la N-acetilcisteína (NAC) sobre la formación de biopelículas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*. Es por esto que nosotros consideramos importante evaluar su acción sobre las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, que causan graves problemas en los pacientes inmunocomprometidos.

Para este trabajo de investigación se recolectaron 62 cepas aisladas de líquidos biológicos y secreciones de pacientes procedentes del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins durante el periodo de Enero a Setiembre del 2006, identificándose el 100% de ellas como cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Para evaluar la capacidad de formar biopelículas de dichas cepas, se prefirió utilizar el método del Agar Rojo de Congo (ARC), por su sensibilidad y reproducibilidad, el cual mostró que el 42% son bacterias formadoras de biopelículas; mientras que el 48% restante son no formadoras de biopelículas. Para esta evaluación se utilizó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 no formadora de biopelícula como control negativo.

Sólo se escogió el 81% de las cepas formadoras de biopelículas para investigar la influencia del mucolítico NAC sobre las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, ya que éstas presentaron mayor producción durante la cuantificación realizada por el Método de O'Toole and Kolter.

La influencia fue evaluada por el método Friedman-Kolter en dos etapas: la primera durante la formación de las biopelículas obteniéndose resultados muy favorables de disminución desde el 39% hasta el 84% y la segunda etapa realizada sobre las biopelículas previamente formada obteniéndose una remoción del exopolisacárido del 14% hasta el 77%; por lo que la NAC podría utilizarse como una alternativa efectiva para prevenir las infecciones resistentes a la terapia antibacteriana y como un inhibidor de la formación de biopelículas en superficies abióticas.

Palabras Claves: *Pseudomonas aeruginosa*, Biopelículas, Agar Rojo de Congo, N-acetilcisteína.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa, is one of the most important human pathogens opportunistic, that can colonizes not only abiotics surfaces, also biotics surfaces. Once colonized these surfaces produce extracellular polysaccharides originating the biofilms formation, in consequence, these bacterias are thousand times more resistant to antibiotics, biocides and disinfectants, constituting a problem of public health.

Nowadays many científics are making investigation to control biofilms formation with the application of differents substances, so the N-acetylcysteine has demonstrated to have negative influence on *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms, for what was important to us evaluate its action on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, which cause serious problems in immunocompromised patients.

For this study, were collected 62 strains isolated from biological fluids and secretions of patients from the Edgardo Rebagliati Martins National Hospital during the period from January to September 2006, indentifying 100% of them like *Pseudomonas aeruginosa* strains. The determination of biofilm production we preferred to use Congo Red Agar Method (ARC), for its sensibility and reproducibility which showed that 42% were biofilm producers, whereas 48% were biofilm non developed. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (non producer) were used as negative control.

Only the 81% of them was chosen to investigate the influence of mucolytic N-acetylcysteine (NAC) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, by the biggest biofilm production during the quantification by O'Toole and Kolter Method.

The influence was evaluated by the Friedman and Kolter Method in two stages: the first during *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formation obtaining good results of decrease from 39% to 84% and the second phase was evaluated on biofilms previously formed obtaining from 14% to 77% of extracellular polysaccharides destruction; for this reason the NAC could be used like an effective alternative to prevent the resistant infections to the antibacterial therapy and so like an inhibitor to biofilm formation on abiotic surfaces .

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Congo Red Agar, N-acetylcysteine,

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones recientes demuestran que el 65% de todas las infecciones bacterianas son causadas por biopelículas, creando una mayor resistencia a biocidas, antibióticos y desinfectantes que las células planctónicas; es importante mencionar que ellas han crecido en forma de biopelículas durante millones de años como parte de una estrategia exitosa para colonizar el planeta y la mayoría de los seres vivos, pero es en las dos últimas décadas que se ha reconocido esta forma de vida bacteriana. Adheridas a una superficie viva o inerte como: el esmalte dental, las piedras de un río, el tejido infectado, tuberías de agua o material biomédico, constituyen en la naturaleza un modo de crecimiento protegido, que permite la supervivencia de las bacterias en un medio hostil. Las estructuras que forman estas microcolonias contienen canales por los cuales circulan los nutrientes, y en las distintas partes de estas biopelículas se expresan genes específicos.

Pseudomonas aeruginosa, es una bacteria gram-negativa común en el ambiente, incluyendo suelo, agua y plantas; es el agente etiológico clave de infecciones adquiridas en hospitales, infectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos.² Puede crecer como una biopelícula de considerable grosor y secretar grandes cantidades de exopolisacárido, así puede presentar una resistencia de hasta mil veces mayor que sus correspondientes células planctónicas²⁷; causando severos problemas como la degradación de los materiales, contaminación de los productos o infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos.

Entre 1993 y 1994 Costerton y colaboradores, determinaron que 100 pacientes asmáticos habían muerto porque los inhaladores de albuterol que usaban contenían *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biopelículas.⁷ Mas tarde O'Toole y colaboradores encontraron que las estructuras como pili y flagelos eran importantes para los primeros estadios de formación de biopelículas en

Pseudomonas.⁴⁰ Es importante para nosotros entender el comportamiento de las biopelículas para realizar un mejor manejo de ellas y de los problemas que causan, así como la implementación de medidas que conduzcan a su prevención y a la generación de agentes que eviten su formación o ayuden a su eliminación. En la actualidad se están realizando trabajos de investigación para encontrar sustancias que nos ayuden a suprimir o disminuir la formación de estas, algunas sustancias como EDTA, citrato de sodio, cloruro de sodio y NAC podrían dispersar las biopelículas formadas por *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁷ Es así que en el año 2003 Olofsson y colaboradores determinaron que la N-acetilcisteína podía servir como un candidato interesante para reducir y prevenir la formación de biopelículas, sobre las superficies inertes en las fábricas de papel.³⁶

Por lo mencionado y con la ejecución del presente trabajo de investigación se pretende contribuir con una sustancia como la N-acetilcisteína que disminuya la formación de biopelículas y además remueva el exopolisacárido presente de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, por ello el objetivo principal fué evaluar la influencia de la N-acetilcisteína sobre las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, en dos etapas: durante la formación de estas y sobre las biopelículas previamente formadas, por lo tanto los objetivos específicos fueron:

- Aislar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de líquidos biológicos y secreciones de pacientes del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.
- Seleccionar las cepas que tienen la capacidad de formar biopelículas por el Método del Agar Rojo de Congo.
- Determinar la acción de la NAC durante la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar la influencia de la NAC sobre biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y cuantificar el exopolisacárido liberado como consecuencia de una posible remoción por acción de la NAC.

I.- GENERALIDADES

1.- BIOPELÍCULAS- BACTERIAS EN COMUNIDADES.-

1.1.- DEFINICIÓN.-

Las biopelículas son la forma de crecimiento más frecuente de las bacterias y se definió en un principio como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido.⁶ Posteriormente, Costerton definió las biopelículas como: «una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes».¹²

La capacidad de formar biopelículas no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas y por su inigual versatilidad metabólica todos los microorganismos son capaces de hacerlo, ya que pueden colonizar superficies bióticas, abióticas, hidrófobas o hidrófilas de cualquier ambiente.^{6,4} (FIGURA Nº 1)

Existe diferencias en la composición de la matriz de las biopelículas de acuerdo al tipo de superficie abiótica donde se forman como por ejemplo: las que se forman en los sistema de agua, son muy complejas ya que contiene productos de corrosión, material de arcilla, y bacterias filamentosas; las biopelículas de los dispositivos médicos, por otro lado, parecen ser compuesto de un solo organismo asociado a la matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS).¹¹

1.2.- ORIGEN DE LAS BIOPELÍCULAS

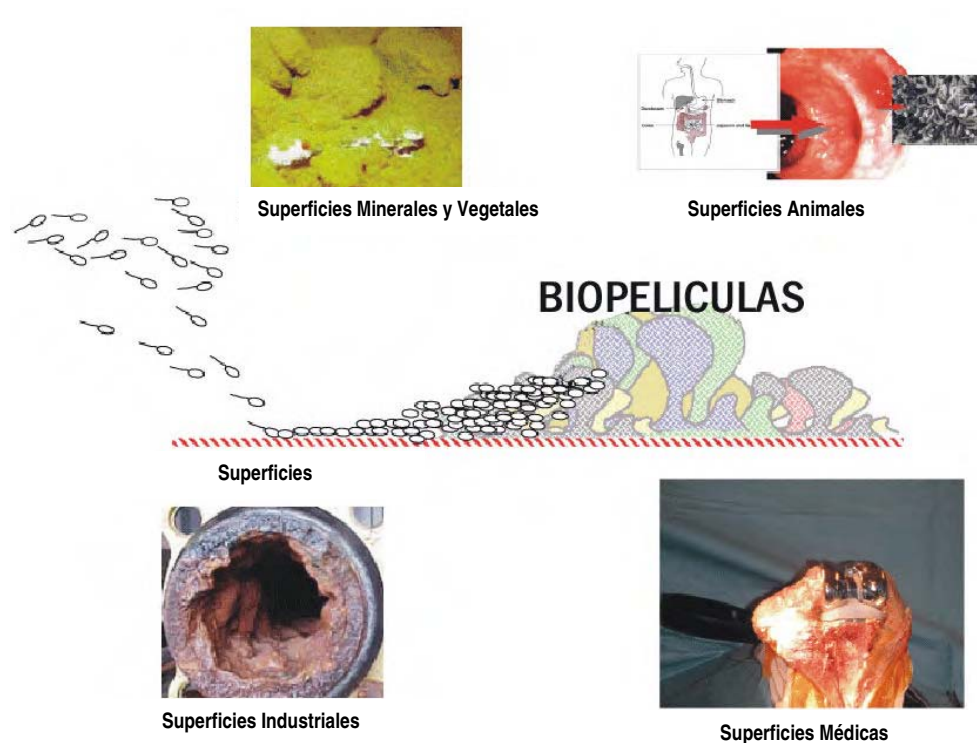
Las biopelículas pueden desarrollarse por medio de dos tipos de procesos:

1.2.1.- A partir de una célula planctónica

Ciertas bacterias muestran o tienen la capacidad de desarrollar estructuras de superficie que favorecen la adhesión de las mismas, tales como fimbrias y fibrillas. Otros factores que favorecen la adhesión de las bacterias a una superficie son la capacidad que muestran algunas especies bacterianas para el movimiento, como la *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, o la expresión de ciertas proteínas en su superficie celular denominadas adhesinas. Una vez que las bacterias están ya adheridas se produce la expresión de ciertos genes que las diferencian de las formas planctónicas. Posteriormente se produce la multiplicación bacteriana y la coagregación con otras especies.

FIGURA Nº 1

SUPERFICIES BIOTICAS Y ABIOTICAS COLONIZADAS POR BIOPELÍCULAS



Genetic of Biofilm Laboratory, Departamento of Microbiology. URA CNRS 2172

1.2.2.- A partir de otra biopelícula

Se pueden desarrollar a partir de células sueltas desprendidas de otras biopelículas o de partes de la misma. En cualquier caso, estas células desprendidas mantendrían todas las propiedades de las biopelículas de donde procedan.⁴⁸

1.3.- ESTRUCTURA DE LAS BIOPELÍCULAS

Las biopelículas están constituidas por tres componentes:

1.3.1.- Masa Celular.-

La cual puede estar formada por una sola especie o por múltiples especies microbiológicas, que representan un 15%- 20% del volumen.⁴⁸

1.3.2.- Espacios Intercelulares o Canales

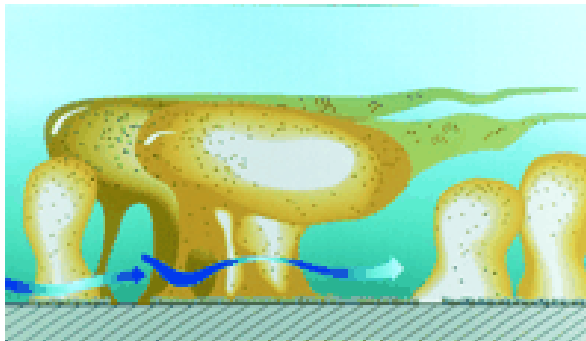
Dentro de la matriz de las biopelículas puede observarse las distintas comunidades bacterianas organizadas, separadas entre sí por microcanales,^{5,48} los cuales permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno hasta las zonas más profundas de las biopelículas, pero la existencia de estos canales no evita que dentro de las biopelículas podamos encontrar ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno son diferentes.^{4,9,50} (FIGURA Nº 2)

1.3.3.- Matriz Extracelular

Representa el 75% - 80%, está compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, sales minerales y material celular.⁴⁸ Los exopolisacáridos representan el componente fundamental de la matriz y participan de forma fundamental en el desarrollo de las biopelículas porque mantienen su integridad. Pueden tener carga neutra o carga polianiónica, e interactuar con distintos antimicrobianos, desinfectantes o biocidas, los cuales quedan atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias, pueden también actuar como fuente de nutrientes para

otras bacterias o atrapar otros nutrientes del medio y ofrecerlos a los distintos tipos bacterianos presentes en la biopelícula. La composición química y la estructura terciaria del exopolisacárido pueden determinar la capacidad de adhesión de las bacterias a las diferentes superficies. También actúan como protectores de condiciones de stress ambiental como rayos ultravioletas, cambios de pH, shock osmótico y evitan su desecación. La pérdida o alteración de un determinado polisacárido puede alterar la biopelícula, o incluso puede producir la desaparición de la misma.²³

FIGURA Nº 2
ESTRUCTURAS DE LAS BIOPELÍCULAS:
EXOPOLISACÁRIDO Y MICROCANALES



Costerton, W., Veitch, R., Shirtliff, M. The application of Biofilm science to the study and control of Chronic bacterial infections. J. Clin. Invest. 2003; 112: 1466 - 1477

1.4.- FASES DE DESARROLLO DE LAS BIOPELÍCULAS

Para el proceso de la formación de biopelículas, existen una variedad de interacciones físicas y metabólicas necesarias para la adhesión, crecimiento y supervivencia, además de aumentar la resistencia de estos grupos a ambientes hostiles para su desarrollo. La biopelículas han sido descritas en hábitats que van desde ambientes acuáticos, superficies de plantas, suelo, aparatos médicos, sistemas de filtración hasta el tracto digestivo de humanos y animales.^{6,20}

La capacidad de la célula para realizar este ataque depende de factores ambientales como la temperatura, pH y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas.^{8,38} Se han identificado cinco fases en el desarrollo de una biopelícula:

1.4.1.- Acondicionamiento de la superficie

Las bacterias son capaces de formar biopelículas gracias a que previamente entran en contacto con la materia orgánica presente en el agua, haciendo que estas se depositen en la interfase agua/ superficie para cambiar las propiedades químicas y físicas de la misma y mejorar las posibilidades de la fijación bacteriana.

Existen factores externos que afectan la adhesión de las bacterias, por un lado factores físicos, como su rugosidad, y químicos de la superficie, y por el otro los factores del medio líquido en el que se desarrolla, como la velocidad del flujo y la composición química del mismo,^{44,48} además de la capacidad de unirse a diversos plásticos, cristal, metales, que depende de las proteínas de su cubierta y de los apéndices motrices. (TABLA Nº 1)

TABLA Nº 1

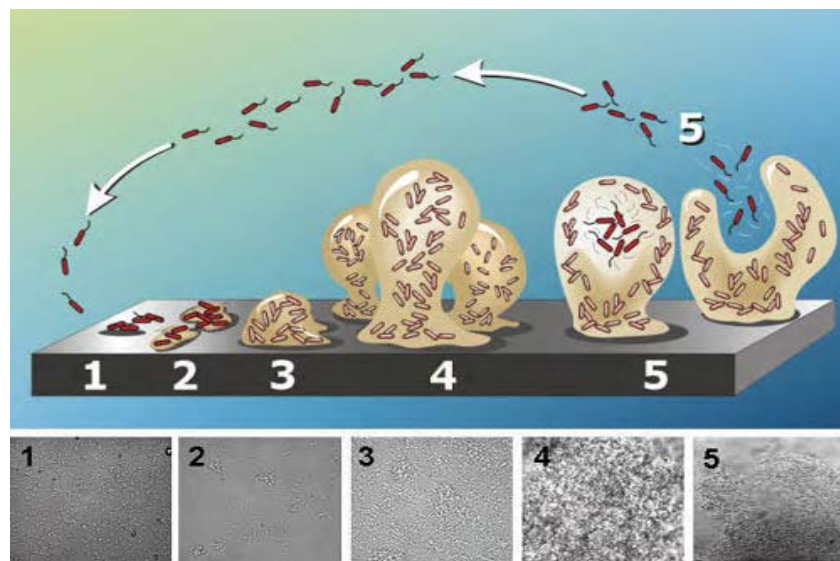
VARIABLES IMPORTANTES EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Propiedades del sustrato	Propiedades del fluido	Propiedades de la Células
Textura o rugosidad Hidrofobicidad Condiciones de la película	Velocidad del fluido pH Temperatura Presencia de cationes	Hidrofobicidad de la superficie celular Fimbrias Flagelos Sustancias poliméricas extracelulares o agentes antimicrobianos

Emerg Infect Dis 8(9), 2002. © 2002 Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Estudios recientes muestran que el acero inoxidable puede ser tan susceptible como el plástico, ya que por acción del aire o de la humedad se empieza a crear una capa de óxido de cromo sobre su superficie dando lugar a la acumulación de la suciedad orgánica, pre-acondicionando el sustrato para la adhesión bacteriana.⁴¹ (FIGURA Nº 3-1)

FIGURA Nº 3
FASES DE DESARROLLO DE LAS BIOPELICULAS



Blicq, D. Biofilms 2007 dblicq@rrc.mb.ca <http://xnet.rrc.mb.ca/davidb/biofilms.htm>

1.4.2.- Adherencia Bacteriana

a.- Adherencia Reversible o Primaria

La adhesión primaria de bacterias a una superficie o a un sustrato puede ser de dos maneras:

- Activa: Gracias a los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV, adhesinas, cápsulas y cargas de superficie, las bacterias pueden alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas.
- Pasiva: Aunque la motilidad ayuda al proceso, igual las bacterias cuentan con la gravedad, difusión y dinámica de fluidos para poder adherirse a cualquier superficie.

Las bacterias que encuentran la superficie acondicionada, forman con ella una unión reversible que depende de las cargas eléctricas de la bacteria, son atracciones de tipo electrostático o hidrófobo y fuerzas de Van der Waals, sin unión química, pero igual favorecen la unión a proteínas, glucoproteínas, o los receptores de polisacáridos sobre la superficie del huésped (tejidos) o de los implantes médicos (prótesis valvulares, ortopédicas, etc.).¹³ (FIGURA N° 4)

b.- Adherencia Irreversible o Secundaria

La unión irreversible significa el anclaje de apéndices bacterianos y la producción de exopolisacárido, de esta forma la bacteria consolida el proceso de adhesión y forma un complejo con el material superficial y receptores, mediante sus ligandos específicos.¹³

Cuando se termina esta fase las biopelículas son difíciles de erradicar de cualquier superficie, tejidos, acero inoxidable, material médico, y mientras más tiempo tenga de formado será más difícil su erradicación. (FIGURA N° 3-2)

FIGURA N° 4
FIJACIÓN DE BACTERIAS SOBRE EL
EPITELIO Y EMISIÓN DE SEÑALES QUÍMICAS



Biofilms Bacterianos: Papel de los Exopolisacáridos en los Procesos Crónicos
Base Científica Exopol. <http://www.exopol.com/autovac/basecientifica2.html>

1.4.3.- Maduración: Matriz Extracelular

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie comienza a dividirse y así permite iniciar la fabricación de una mezcla de polímeros que excreta al exterior para mantener unidas las células, entre ellas y con la superficie. El exopolisacárido es excretado desde la pared celular bacteriana y se estructura a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, que suman a la adherencia, la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar los nutrientes que encuentre. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae* hasta poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir además de alginato un polisacárido rico en glucosa que forma una película en la interfase medio aire al que se ha denominado “Pellican”.²⁴ (FIGURA N° 3-3)

1.4.4.- Cooperación entre especies.-

Dentro del exopolisacárido de las biopelículas se pueden encontrar otras especies, estas pueden haber quedado atrapadas en la matriz extracelular por captación física o atracción electrostática, pero las diferentes especies viven en un nicho mínimo especializado. Si una especie genera residuos tóxicos la otra los devorará con avidez, así se consigue coordinar los recursos bioquímicos de todos los habitantes de la biopelícula. (FIGURA N° 3-4)

1.4.5. - Crecimiento y Dispersión.-

La colonia en división continua libera residuos y nutrientes que podrán utilizarse para acondicionar la nueva superficie y para alimentar a otras células.³¹

Si las condiciones de flujo hídrico lo permiten, el equilibrio que se establece entre el crecimiento de la colonia y el movimiento del agua libera pocas células, pero con un flujo intenso o turbulento se pueden liberar muchas más. (FIGURA Nº 3-5)

1.5.- PROPIEDADES DE LAS BIOPELÍCULAS

1.5.1.- Heterogeneidad Fisiológica

Dentro de las biopelículas puede observarse un rango muy amplio de micronichos, separados por mínimas distancias, asimismo, se pueden encontrar ambientes muy diferentes en cuanto al contenido de nutrientes del medio, tensión de O₂, tensión de CO₂, pH, etc. Por lo tanto, células de la misma especie bacteriana pueden presentar estadios fisiológicos muy diferentes, y también pueden encontrarse especies bacterianas con distintas necesidades fisiológicas.^{5,48,56}

1.5.2.- Fenotipos en las Biopelículas

Cuando las bacterias crecen en las biopelículas formadas, en forma sésil, manifiestan un fenotipo diferente respecto del que manifiestan cuando crecen en forma planctónica. Por tal motivo los fenotipos de las bacterias que crecen en las biopelículas son más resistentes frente a diversos antimicrobianos y mantienen esta resistencia incluso cuando se desprenden de la biopelícula.⁴⁸

1.5.3.- Señales en las Biopelículas

Actualmente, se acepta que muchas especies bacterianas usan como “lenguaje”, señales químicas generadas por ellas mismas, llamadas autoinductores (AI). Los cuales les permiten coordinar actividades amistosas (simbiosis) o adversas (patogénicas) con su hospedero, participan también en la determinación de densidad poblacional, activación o represión de genes específicos, formación de biopelículas bacterianas, etc.¹⁰ Cuando se trata de pocas bacterias, los niveles de AI permanecen indetectables; sin embargo, a medida que aumenta el número de

bacterias la cantidad de AI, también se ve incrementada. Esto permite que las bacterias “registren” su densidad poblacional y en respuesta se activen o repriman genes específicos y este sistema de comunicación se le conoce como “quórum sensing”.¹⁰

En las bacterias Gram negativas el principal autoinductor es la acilhomoserina lactona, mientras que en las bacterias Gram positivas los autoinductores son péptidos. Así mismo se ha demostrado que otros reguladores globales como CsrA en *E. coli*, CytR de *V. cholerae*, son importantes para el desarrollo de biopelículas de estas bacterias.⁵² Finalmente, parece lógico que la formación de la biopelícula se produzca en respuesta a las condiciones ambientales y por tanto que existan sistemas de fosfotransferencia de dos componentes que transmitan la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental.⁵¹

1.5.4.- Capacidad Adaptativa

Las biopelículas deben mantener un equilibrio, por un lado, entre el crecimiento en condiciones favorables en cuanto a aporte de nutrientes y de medio ambiente, y por otro, el mantenimiento de su estructura. En condiciones desfavorables, las biopelículas pueden involucionar a estadios anteriores, pero en casi todas las situaciones se mantiene como parte del mismo y unido a la superficie, pudiendo volver a desarrollarse cuando las condiciones mejoran.

1.6.- RESISTENCIA DE LAS BIOPELÍCULAS

Se ha podido demostrar que las células de las biopelículas pueden resultar entre 10 y 1000 veces más resistentes, que las células planctónicas correspondientes a un gran número de antibióticos de amplio espectro (ampicilina, estreptomycin, tetraciclinas, gentamicina, etc.)²⁷ y de biocidas oxidantes del tipo del cloro, el yodo o el ozono. En la actualidad se está trabajando mucho para controlar las infecciones bacterianas, pero es conocido que tenemos dos tipos de resistencia bacteriana, las bacterias que son resistentes a los medicamentos causadas por alguna mutación

de genes y las bacterias que crecen dentro de biopelículas presentando gran resistencia frente a biocidas, desinfectantes o antimicrobianos que las células que viven en forma planctónica.

La resistencia es la habilidad de un microorganismo para crecer en presencia de una elevada concentración de antimicrobiano ó un pequeño grupo de cepas en las cuales la concentración mínima inhibitoria (MIC) se ha incrementado, pero en las biopelículas se entiende como un incremento de la resistencia de las células atacadas.²² Los mecanismos por los cuales se hacen más resistentes aún no son completamente claros; pero se han considerado los siguientes:

1.6.1.- Penetración Restringida y Degradación de Antibióticos

La penetración es restringida debido a la presencia del exopolisacárido de la matriz que limita la difusión de sustancias y la unión del antimicrobiano proporcionando una efectiva resistencia a las células en su interior. La obstaculización de la difusión es probablemente efectiva contra pequeños péptidos antimicrobianos de numerosas defensinas, por otra parte, la carga negativa de los exopolisacáridos es muy efectiva contra antibióticos cargados positivamente como los aminoglucosídeos, por presentar restricción de la permeabilidad durante toda la unión.²²

1.6.2.- Baja tasa de Crecimiento

Generalmente todos los antibióticos son muy efectivos en el ataque rápido de las células en crecimiento, condición que es absolutamente requerida por algunos antibióticos para poder atacar. La Penicilina y la Ampicilina no atacan células que no estén en crecimiento y la tasa de ataque es proporcional a la tasa de crecimiento. Algunos de los más avanzados β lactámicos, como cefalosporinas, aminoglucosidos y fluoroquinolonas pueden atacar células en fase estacionaria, pero ellos son indistintamente más efectivos en el ataque rápido de células en división.

Otro mecanismo por el cual la disminución del crecimiento contribuye a la resistencia de las biopelículas es el gradiente químico que se establece dentro, el oxígeno es conocido por modular

la acción de los aminoglucósidos y los gradientes de pH pueden impactar negativamente la eficiencia de los antibióticos.²²

1.6.3.- Cambios Fenotípicos

Las bacterias expresan genes en respuesta a fluctuaciones ambientales como cambios de temperatura, oxidación, baja disponibilidad de oxígeno, daños de ADN, los cuales se transfieren entre ellas logrando un mecanismo de supervivencia específico y la resistencia al ataque de numerosos agentes, como el caso de la β galactocidasa, la cual es expresada en respuesta al Imipenen y la Piperamicina; o las bombas de difusión de multiresistencia a los medicamentos como la expresada por *E. coli* en respuesta al cloramfenicol.²²

1.6.4.- Persistencia y Tolerancia Bacteriana

Es el último factor considerado recientemente, las bacterias de las biopelículas no solo evaden el ataque de los antibióticos, también resisten a los desinfectantes químicos. La persistencia de una población de células puede considerarse por su extensa resistencia gracias a las células persistentes que son altamente protectoras y puede deberse a:

- La dimensión bifásica de la biopelícula, en el cual gran parte de la población es atacada rápidamente pero una pequeña fracción de células no es afectada aún con un prolongado tratamiento con antibióticos.
- Los genes que contribuyen a la persistencia codifican proteínas que actúan como circuitos reguladores que determinan la entrada y el éxito de este estado como la buena y específica respuesta protectora.
- Los antibióticos bacteriostáticos que inhiben el crecimiento paradójicamente contribuyen a la persistencia y a la preservación de la biopelícula; la persistencia es dependiente de la dosis del antibiótico y del tiempo de duración del ataque.

Solos o en combinación, estos factores son usados para explicar la supervivencia de las bacterias dentro de estas comunidades.²¹

1.7.- BIOPELÍCULAS EN EL MEDIO AMBIENTE

Las biopelículas son un problema severo tanto en las ciencias médicas, ya que se encuentran en la placa dental, en lentes del contacto, en dispositivos prostéticos, y en implantes médicos¹; así como también en las industrias originando problemas como el incremento de resistencia friccionar de fluidos en los conductos de agua, disminución de la transmisión de calor de una bolsa de calor, corrosión de sustratos metálicos y contaminación en la comida e industrias biotecnológicas.

(TABLA N° 2)

TABLA N° 2
GÉNEROS BACTERIANOS AISLADOS EN SISTEMAS
DE AGUA EN UNIDADES DENTALES

GENERO BACTERIANO	%
<i>Legionella</i>	68
<i>Leptospira</i>	20
<i>Mycobacterium</i>	19
<i>Staphylococcus</i>	16
<i>Sphingomonas</i>	14
<i>Moraxella</i>	12
<i>Flavobacterium</i>	9
<i>Bacillus</i>	7
<i>Escherichia</i>	6
<i>Geobacter</i>	5
<i>Pseudomonas</i>	5

Rivera, J. A. and Román, C. Biopelículas y salud pública.
ANALES MEDICOS Oct. - Dic 2005; 50 (4): 172 – 76

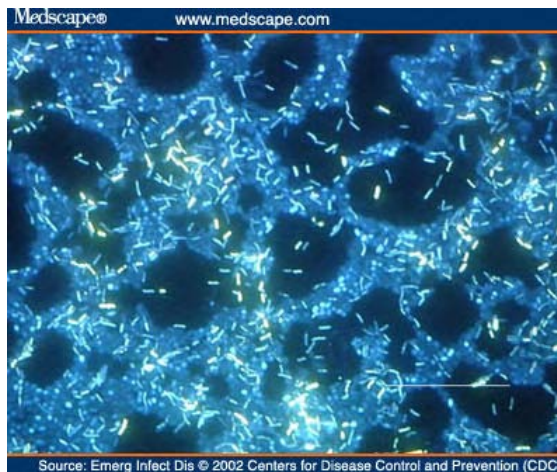
1.7.1.- Biopelículas en la Industria

Están implicadas en diversos ámbitos constituyéndose en un enemigo cuando están involucradas en el “*biofouling*” o en un aliado cuando se utilizan en biorremediación.

“Biofouling”

El 70% de toda corrosión en los sistemas de agua son causados por las biopelículas, se ocasionan por la actividad metabólica de consorcios bacterianos formados en muchos casos por bacterias sulfato reductoras (BSR) y por las características propias de la superficie del material que permite el crecimiento de ellas. En los oleoductos y en general, en todas las tuberías, la formación de biopelículas como comunidades viscosas ocasiona el taponamiento de filtros y orificios de estas estructuras produciendo disminución del fluido normal.¹ (FIGURA N° 5)

FIGURA N° 5
BIOPELÍCULA POLIBACTERIANA FORMADA EN
SUPERFICIES LIMPIAS DE ACERO



Donlan, R. Biofilms: Microbial Life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. Centers for Disease Control and Preve (CDC). 8 (9), 2002

Las bacterias anaerobias pueden propagar en las capas más profundas de las biopelículas donde los alcances de oxígenos son mínimos. Algunos de estos anaerobios son capaces de metabolizar el carbono del acero limpio, y algún producto nítrico, ácidos orgánicos sulfúricos u otros que más allá aceleran la corrosión.

Bioremediación de aguas residuales

Las aguas residuales domésticas e industriales son ricas en materiales orgánicos y deben ser tratadas antes de devolverlos al ambiente. Los procesos para el tratamiento utilizan biopelículas en los cuales las sustancias orgánicas de los desechos se degradan a dióxido de carbono, gas metano y otros nutrientes inorgánicos.¹

Bioremediación de suelos y aguas subterráneas.

Cuando los suelos o las aguas se contaminan con hidrocarburos como el petróleo, las biopelículas cumplen un papel fundamental en su bioremediación. Las bacterias oxidantes de los hidrocarburos son capaces de adherirse a las gotas insolubles de petróleo y de lograr la dispersión de la capa. Estas biopelículas están conformadas básicamente por especies de *Pseudomonas*, corinebacterias, micobacterias y algunas levaduras. Sin embargo, para el buen desempeño de la biopelícula se requieren condiciones especiales de oxígeno, temperatura, pH, nutrientes, sin las cuáles la bioremediación no se produce.¹

1.7.2.- Biopelículas y Enfermedades

Muchas de las infecciones en el humano son causadas por la formación de biopelículas incluyendo la caries dental, la enfermedad periodontal, otitis media, infecciones músculo-esqueléticas, infección del tracto biliar, endocarditis bacteriana y neumonías en pacientes con fibrosis quística, estas enfermedades a diferencia de infecciones en donde se conoce el agente causal específico, son de transcurso crónico y persistente, lo que hace difícil su erradicación. *Pseudomonas aeruginosa* se ha encontrado en pulmones de personas con fibrosis quística produciendo infecciones y generando dificultades en la recuperación de éstos.¹ (TABLA Nº 3)

2.- GÉNERO *Pseudomonas*

2.1.- DEFINICIÓN

Pseudomonas son bacilos rectos o ligeramente curvados, gram negativos, oxidasa positivo, aeróbicos estrictos, aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. El catabolismo de los glúcidos se realiza por la ruta de Etner-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Algunos miembros del género son psicrófilos, otros sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso con gran valor taxonómico. Es común la presencia de plásmidos, no forman esporas y encuadran dentro del grupo y de las proteobacterias.

En general son inocuas para el hombre, también existen: patógenos oportunistas como *P. aeruginosa*; patógenos de animales y patógenos de plantas como *P. syringae*. Son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, y muestran una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas. Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, lo cual les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizar ambientes y nichos que difícilmente son colonizables por otros microorganismos.¹⁴ (CUADRO N° 1).

2.2.- *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria importante para el hombre tanto porque le representa problemas, como porque puede ser útil en el tratamiento de la contaminación ambiental. Nosotros estamos en contacto diariamente con *P. aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza, de hecho, se obtienen aislamientos entre el 2 y el 8% de esta bacteria de las heces de la personas sanas, pero sólo representa una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales.¹⁹ Se ha reportado su aislamiento de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón.

TABLA Nº 3
MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS CON INFECCIONES
EN EL HUMANO Y QUE PUEDEN FORMAR BIOPELÍCULAS

INFECCION	MICROORGANISMO(S) PRESENTE(S)
Endocarditis valvular	<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i>
Otitis media	<i>Streptococcus</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i>
Prostatitis bacteriana	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Corynebacterium</i>
Fibrosis quísticas	<i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Burkholderia</i>
Periodontitis	<i>Fusobacterium</i> , <i>Peptoestreptococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Haemophilus</i>

Rivera, J. y Román, C. Biopelículas y salud pública. ANALES MEDICOS Oct.-Dic 2005; 50 (4): 172 –76

2.2.1.- Variabilidad Genética

El tamaño aproximado del único cromosoma circular que forma el genoma de esta bacteria es grande, cerca de 6.3 millones de pares de bases, esta característica la comparte con otras proteobacterias y con bacterias gram-positivas como es el caso de *Streptomyces coelicolor* A3.

Presenta homología en la secuencia y en la organización genética con bacterias ambientales, es notoria la gran cantidad de genes que parecen codificar para bombas que sacan compuestos de

la célula, la abundancia de estos transportadores pudiera estar relacionada con su alta resistencia a distintos compuestos tóxicos y con su extraordinaria versatilidad.

Pero existe una gran variabilidad genética entre distintos aislamientos de esta bacteria aun aislada en la misma región, y se ha encontrado una alta frecuencia de rearrreglos génicos. La secuencia de los genes comunes está altamente conservada entre los distintos aislamientos de esta bacteria, a excepción del gen *pilA* que codifica para la fimbria tipo IV y que presenta un gran polimorfismo. La alta frecuencia de recombinación entre las distintas clonas mantiene una información genética común a toda la especie, de este modo tiene una parte de su genoma altamente conservada y una proporción menor, pero significativa, que es distinta en cada clona de esta bacteria.^{26, 34}

CUADRO Nº 1
CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

<i>Pseudomonas</i>	
Clasificación científica	
<u>Reino:</u>	Bacteria
<u>Filo:</u>	Proteobacteria
<u>Clase:</u>	Gamma Proteobacteria
<u>Orden:</u>	Pseudomonadales
<u>Familia:</u>	Pseudomonadaceae
<u>Género:</u>	<i>Pseudomonas</i>
Especies	
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mallei</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. maltophilia</i>
<i>P. fragi</i>	<i>P. acidovorans</i>
<i>P. putida</i>	<i>P. alcaligenes</i>
<i>P. syringae</i>	<i>P. testosteroni</i>
<i>P. denitrificans</i>	<i>P. vesicularis</i>
<i>P. oleovorans</i>	<i>P. diminuta</i>
<i>P. phaseolica</i>	<i>P. solanacearum</i>
<i>P. stutzeri</i>	<i>P. marginalis</i>
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>P. sachorophila</i>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>

2.2.2.- Plásmidos

Las bacterias del género *Pseudomonas* tienen la capacidad de catabolizar distintos hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Esta característica generalmente está codificada en plásmidos, llamados catabólicos, que casi siempre se encuentran en cepas de *P. putida* y rara vez en *P. aeruginosa*. En el caso de esta última bacteria su enorme versatilidad metabólica parece deberse al gran número de genes cromosomales que codifican para enzimas con actividades novedosas. Los plásmidos que se presentan en *P. aeruginosa* codifican para resistencias a antibióticos,¹⁶ a metales, y su extensa distribución representa un problema clínico.

2.2.3.- “Quórum sensing”

Recientes estudios han identificado que en *Pseudomonas aeruginosa*, existen alrededor de 39 genes que están altamente regulados por el “quórum sensing”, estimándose que alrededor del 4% de los 6000 genes que se encuentran en esta bacteria son controlados por este mecanismo.⁵⁵

Usa un complicado sistema de comunicación, en parte para la regulación de la virulencia, asegurando que los factores activadores de la respuesta inmune del hospedero no sean manifestados, sino hasta que se haya alcanzado un importante número de bacterias. De esta manera, se garantiza que la invasión bacteriana sea más efectiva, ya que si la bacteria es forzada a producir prematuramente factores de virulencia, el hospedero puede reconocer y erradicar la invasión bacteriana desde un principio, cuando la población bacteriana es aún baja.¹⁰

Esta organización bacteriana determinada por producción de múltiples autoinductores y el sistema “quórum sensing”, pueden no solamente estimular la respuesta inmune del hospedero, sino que también evadirla.²² Dos de estos sistemas denominados Las y Rhl, han sido muy bien caracterizados a nivel molecular, sin embargo, se ha reportado un tercer regulador transcripcional

llamado QscR, que a diferencia de los otros dos sistemas mencionados, tiene un papel negativo en la regulación de la respuesta.²⁵

Se sabe que los sistemas Las y Rhl interaccionan entre sí de una manera muy compleja para promover la expresión de los genes involucrados en la patogénesis de *P. aeruginosa*, además el activador transcripcional LasR promueve la transcripción de distintas proteasas involucradas en la virulencia de esta bacteria como son las elastasas A y B y la proteasa alcalina, así como la exotoxina S.⁴³

Se ha reportado otros metabolitos que también participan en la virulencia de la bacteria, como la piocianina, que están bajo el control del sistema Rhl. Algunos de los productos de los genes regulados por el sistema Rhl, como los ramnolípidos y la piocianina sólo se expresa en ciertas condiciones de cultivo, como puede ser condiciones de limitación de ciertos nutrientes, como el fosfato o el nitrógeno en el caso de los ramnolípidos, de modo que en un medio rico, aun en altas densidades celulares, no se expresan.³²

Se encontró que la expresión genética se ve afectada, principalmente al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, pero no es exclusivamente en esta etapa, sino que puede ocurrir a todo lo largo de la curva de crecimiento.⁴⁵

2.2.4.- Formación de biopelículas

Como ya se ha comentado anteriormente las biopelículas tiene en su composición las células, la matriz extracelular y los microcanales. Recientemente se ha reportado que los ramnolípidos tienen un papel importante en la formación de estos microcanales, así como que la matriz extracelular está constituida en parte por alginato, pero éste no constituye el material más abundante.

Se sabe también que el exopolisacárido de *P. aeruginosa* es un factor de virulencia, y a diferencia de otras bacterias esta molécula presenta dos componentes distintos: la banda A y la banda B.³

Se ha determinado que la causa más frecuente de la conversión a mucoidía de las cepas de *P. aeruginosa* en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística es la mutación en el gen que codifica la proteína MucA, que es un factor anti-sigma. En las cepas silvestres de *P. aeruginosa* el factor anti-sigma MucA inactiva al factor sigma AlgU. Los aislamientos mucoides de enfermos de fibrosis quística producen muy bajos niveles de proteasas y otros factores de virulencia regulados por el “quórum sensing” Las, pero producen niveles normales o elevados de ramnolípidos,³⁷ que se regula por el sistema “quórum sensing” Rhl.

2.2.5.- Motilidad

P. aeruginosa tiene tres formas de desplazarse, en medios líquidos se desplaza “nadando” mediante un único flagelo polar, mientras que sobre las superficies tiene dos formas para moverse. Una de ellas es por un mecanismo llamado “twitching” que depende de las fimbrias o pili tipo IV, y la otra es la motilidad tipo “swarming”, que se realiza en medios semi-sólidos, es un movimiento concertado de las células en las que se vuelven alargadas y presentan múltiples flagelos. Se han descrito más de 35 genes involucrados en la biogénesis, regulación y funcionamiento de la fimbria tipo IV de *P. aeruginosa*.⁵⁴ Muchos de estos genes tienen homología con genes involucrados en la secreción de proteínas y la incorporación de ADN a la célula en distintas bacterias. Es interesante mencionar que el activador transcripcional AlgR, que activa los genes para la biosíntesis de alginato, tiene un papel central en la expresión de la fimbria tipo IV.⁵³

2.3.- INDUSTRIAS Y *Pseudomonas aeruginosa*

2.3.1.- Producción de biosurfactante

Los biosurfactantes tienen un gran potencial biotecnológico ya que son biodegradables y no son tóxicos. En condiciones de laboratorio *P. aeruginosa* produce primordialmente dos formas del

biosurfactante ramnolípido, una que contiene una molécula de ramnosa y la otra tiene dos,, utilizándolos para solubilizar sustratos hidrofóbicos como el hexadecano, sin embargo muchos aislamientos no usan hexadecano. La principal utilidad de los ramnolípidos es la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos²⁸ o con metales pesados, asimismo se reportó que pueden matar en bajas concentraciones a hongos zoospóricos, importantes patógenos de plantas comerciales, de modo que también tienen un potencial en el control biológico de estas plagas.

2.3.2.- Producción de polihidroxicanoatos

P. aeruginosa almacena como reserva de carbono, en condiciones de limitación de nitrógeno, polihidroxicanoatos (PHA) de 10 a 14 carbonos y, una vez que la bacteria se encuentra en un medio propicio, se degradan mediante la β -oxidación. Este polímero tiene gran potencial biotecnológico ya que se utiliza para la producción de plásticos que son biodegradables.³⁵

2.3.3.- Degradación de alcanos de cadena ramificada

Algunos hidrocarburos se acumulan en el medio ambiente debido a su baja biodegradabilidad, pero se ha reportado que las cepas de *P. aeruginosa* tienen la capacidad de degradar este tipo de compuestos y por tanto son útiles en la limpieza de ambientes.⁴⁷

2.4.- CAMPO HOSPITALARIO Y *Pseudomonas aeruginosa*

Representa un problema importante de salud pública en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes inmunocomprometidos. Una vez que se establece la infección, produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Entre las proteínas que intervienen en la infección encontramos las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta situación se ve

agravada por la dificultad para tratar las infecciones, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos.⁴⁶

Colonizan eficientemente el tracto respiratorio y a medida que progresa la infección se seleccionan derivados mucoides de la bacteria que producen grandes cantidades del exopolisacárido alginato. Una vez que se establece la infección en los pulmones de pacientes con fibrosis quística, estos están en la etapa terminal de la enfermedad.¹⁸

2.5.- RESISTENCIA NATURAL A ANTIBIÓTICOS

En las biopelículas formadas por *Pseudomonas* se ha podido demostrar un sinergismo entre la difusión retardada del antibiótico y la degradación de este, ya que la matriz de exopolisacáridos puede actuar como una barrera retardando la difusión del antimicrobiano y en su interior, enzimas semejantes a las β -lactamasas lo destruirán, logrando así, una resistencia efectiva.

Otro aspecto a considerar en la difusión del antimicrobiano a través de la biopelícula es la heterogeneidad de su estructura, la membrana externa de las bacterias gram-negativas, formada principalmente por lipopolisacárido, permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y tiene muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos, esta permeabilidad depende principalmente de las porinas, que son proteínas formadoras de poros con una baja especificidad, y de los sistemas de transporte específicos.

Sin embargo, la resistencia a antibióticos intrínseca como la adquirida, dependen principalmente de la presencia de un gran número de transportadores que secretan estos compuestos al exterior de la célula. El mayor número de estos transportadores se agrupan en dos familias, según su parecido estructural, una de ellas está formada por los sistemas llamados eflux, y la otra se denomina MFS. Los sistemas eflux están formados por tres proteínas, un intercambiador droga-protón, presente en la membrana interna, una proteína de membrana externa que parece formar un canal y una proteína periplásmica que une a las dos proteínas membranales.³³

3.- N-ACETILCISTEÍNA (NAC).-

Es un expectorante derivado del aminoácido cisteína con un efecto mucolítico, su acción consiste en diluir la viscosidad de la secreción, ya que tiene la capacidad de destruir las distintas estructuras químico-físicas de la secreción bronquial anormal, consiguiendo la disminución de la viscosidad y, de esta forma, una más fácil y pronta eliminación. Su mecanismo se basa en la ruptura de puentes disulfuro las cuales enlazan las fibras de polisacáridos, lisis de mucoproteínas de la secreción bronquial (responsables del mantenimiento de la estructura terciaria de las glucoproteínas constituyentes del moco), produciendo así la fragmentación de las cadenas de mucinas, inmunoglobulinas A y seroalbúmina de dicha secreción, de ADN y disminución de la adhesividad de las secreciones. El factor decisivo para el efecto mucolítico de la NAC no es su estado de acetilación sino los grupos sulfidrilos (SH) disponibles en ella, como también en la cisteína y el glutatión, siendo mayor su eficacia mucolítica en medio alcalino (pH 7,5 - 9,0).

Numerosos estudios han demostrado mejoras en pacientes con bronquitis crónica después del tratamiento con NAC. Marchese A. y colaboradores evaluaron el efecto inhibitorio que presenta la fosfomicina en comparación con la asociación de fosfomicina y NAC en biopelículas de *Escherichia coli*, determinando que la acción de dicha asociación tiene un mayor efecto inhibitorio que la fosfomicina sola.²⁸ Además Perez-Giraldo y colaboradores determinaron que la cantidad de biopelícula formada por *Staphylococcus epidermidis* esta en relación inversa a la concentración de la NAC.⁴² La N-acetilcisteína podría tener influencia negativa sobre las biopelículas, aunque aún no se ha podido entender el mecanismo por el cual operan, pero si se ha observado que tienen propiedades antibacterianas (bacteriostáticas) aunque no pertenezca al grupo de estos medicamentos. Puede ejercer mayor acción sobre las cepas Gram positivas que sobre las Gram negativas, esto se puede deber a la presencia de la segunda membrana celular que presentan las bacterias Gran negativas.

II.- PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiológica y Biotecnológica “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se analizaron un total de 62 cepas aisladas de líquidos y secreciones biológicas procedentes de pacientes del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins recolectadas durante el periodo de Enero a Septiembre del 2006.

1.- MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

1.1.- MATERIALES.-

- Placas Petri estériles de vidrio 15 x 100 mm. (PIREX)
- Viales de borosilicato de 10 mL para la recolección de cepas (PIREX).
- Probetas de 100 mL ((PIREX).
- Matraces de 250 mL (PIREX).
- Tubos de Ensayo de vidrio (borosilicato) estériles de 10 mL (PIREX).
- Pipetas estériles de 1, 5 y 10 mL (PIREX).
- Asa de Kohle.
- Micropipetas de 5 – 50 uL (TRASFERPETTE)
- Micropipetas de 10 – 100 uL (TRASFERPETTE)
- Micropipetas de 200-1000 uL. (TRASFERPETTE)
- Pinzas estériles.
- Microplacas de Poliestireno estériles (FALCON).

1.2.- REACTIVOS.-

- Caldo Trypticasa de Soya (MERCK).
- Agar Trypticasa de Soya (OXOID).
- Solución salina fisiológica (0.9 %).
- Solución de Cristal Violeta al 1 % .
- N-acetilcisteína (aminoácido Flumucil- Zambon).
- Dimetilsulfóxido (MERCK).
- Etanol absoluto (MERCK).
- Agua destilada.
- Ácido sulfúrico (77% P/P) (MERCK).
- Triptófano al 1% (P/P) (MERCK).
- Agar Rojo de Congo (ANEXO 1).

1.3.- EQUIPOS .-

- Autoclave (FAVRILL).
- Potenciometro (HANNA pH 112)
- Estufa de 37° C (MEMMERT).
- Estufa de 30°C (MEMMERT).
- Balanza Analítica Denver Modelo XP-300.
- Lámpara de Luz Ultravioleta Termo Spectronic GENESYS 20 MODELO UV LAMP UV.
- Sonicador (ULTRASONS – H PSELECTA).
- Vortex (FISHER Mini Shaker).
- Cámara de 4° C (COOL SYSTEMS SAC).

2.- MATERIAL BIOLÓGICO.-

- Cepas Hospitalarias de aisladas de líquidos y secreciones biológicas de pacientes del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 (NO FORMADORA DE BIOPELÍCULA)

3.- METODOLOGÍA DE TRABAJO

3.1.- RECOLECCION DE MUESTRAS

Se recolectó las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en viales estériles con 5mL de Agar Tripticasa de Soya (TSA) en el laboratorio de Microbiología procedentes de líquidos biológicos y secreciones de pacientes del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

3.2.- IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *Pseudomonas aeruginosa*.-

La identificación de las cepas fué realizada por el laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins con paneles MICROSCAN®, los cuales están diseñados para determinar la sensibilidad a agentes antimicrobianos y la identificación a nivel de especie de bacilos gram negativos aerobios y anaerobios facultativos.

Se realizó la confirmación de las cepas con las pruebas microbiológicas como la Tinción Gram, crecimiento en Agar Cetrimide, crecimiento en Agar Mac Conkey, producción de Oxidasa y crecimiento con características específicas en el medio Agar Hierro de Kligler (KIA) en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiológica y Biotecnológica “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3.- SELECCION DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS.-

Como se ha mencionado anteriormente no todas las bacterias tienen la capacidad de formar biopelículas, es por esto que se tuvo que realizar la selección de las cepas que presentaban esta característica. Existen dos métodos muy utilizados para esta evaluación el Método del tubo¹⁵ y el Método del Agar Rojo de Congo,¹⁵ se ha considerado trabajar con ambos métodos para escoger el más adecuado.

A.- Método del Tubo (O'Toole-Kolter)³⁹

Este método se basa en la tinción de las células con una solución al 1.00 % del Colorante Cristal Violeta y en la cuantificación del mismo en el espectrofotómetro. Consistió en inocular 2 mL de una dilución de las cepas en estudio, de densidad óptica (OD) igual a 0.005 a 600nm, las cuales habían sido revivificadas por 10 horas en TSB, en tubos de vidrio (borosilicato) e incubadas durante 48 horas. Luego se lavaron los tubos con 5 mL de SSF por tres veces y se dejaron secar a TA, se adicionó 2.4 mL de Cristal Violeta al 1% y se incubaron por 20 min. a TA, transcurrido este tiempo se lavaron los tubos con 5 mL de agua destilada por tres veces y se dejaron secar a TA.

Finalmente se adicionó 2.4 mL de Etanol absoluto y las muestras se incubaron a TA durante 20 min., luego los tubos fueron leídos en la Lámpara de Luz Ultravioleta Termo Spectronic GENESYS 20 MODELO UV LAMP UV a 580nm y se realizó un blanco. (FOTOGRAFÍA N° 1)

B.- Método del Agar Rojo de Congo (ARC) de Friedman-Kolter¹⁵

El Agar Rojo de Congo¹⁵ es un método muy utilizado que se fundamenta en la reacción que ocurre entre el exopolisacárido de la biopelícula y el indicador produciendo una coloración roja oscura, y como sabemos las bacterias que crecen en forma planctónica. Por lo tanto se procedió a evaluar las cepas con este método. Este método consistió en sembrar una alícuota de 10 uL de una dilución de densidad óptica (OD) igual a 0.005 a 600 nm de las cepas en estudio sobre el Agar Rojo de Congo,¹⁵ revivificadas previamente durante 10 hr. en Caldo Tripticasa de Soya (TSB). Luego se incubaron las placas a temperatura ambiente (TA) durante 48hr.

Las bacterias productoras de biopelículas crecieron como colonias rojas oscuras sobre el Agar Rojo de Congo, mientras que las colonias no formadoras de biopelículas crecieron como colonias blanquecinas o ligeramente rosadas. Las cepas fueron evaluadas por duplicado. (FOTOGRAFÍA N° 2)

3.4.- SELECCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE MAYOR CANTIDAD DE BIOPELÍCULAS.-

Para obtener mejores resultados en la evaluación de la influencia de la N-acetilcisteína sobre las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, se necesitaba seleccionar las cepas que formaran mayor cantidad de biopelículas. Para realizar esta evaluación se utilizó el método anteriormente descrito por O'Toole-Kolter.³⁹

Se inoculó 2 mL de una dilución de las cepas en estudio de densidad óptica (OD) igual a 0.005 a 600nm en tubos de vidrio (borosilicato), revivificadas previamente en TSB por 10 horas; luego se incubaron durante 96 horas. Transcurridas las primeras 48 hr. se lavaron los tubos sólo una

FOTOGRAFÍA N° 1

METODO DEL TUBO



Método excelente para la cuantificación de biopelículas, pero no es sensible para la identificación de cepas formadoras de biopelículas.

FOTOGRAFÍA N° 2

METODO AGAR ROJO DE CONGO



Método altamente sensible, rápido y reproducible

vez con 5 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF) y se adicionó nuevamente 2 mL de TSB.

Cumplidas las 96 hr. se procedió a lavar los tubos con 5 mL de SSF por tres veces y se dejaron secar a TA. Luego se adicionó 2.4 mL de Cristal Violeta al 1% y se incubó por 20 min. a TA, transcurrido este tiempo se lavaron los tubos con 5 mL de agua destilada por tres veces y se dejaron secar a TA. Finalmente se adicionó 2.4 mL de Etanol absoluto y se incubó a TA durante 20 min., transcurrido este tiempo se procedió leerlos en la Lámpara de Luz Ultravioleta Termo Spectronic GENESYS 20 MODELO UV LAMP UV a 580nm. Las muestras fueron evaluadas por triplicado. La cuantificación se obtuvo de forma directa ya que la coloración presentada por el tubo era directamente proporcional a la cantidad de biopelícula producida.

3.5.- INFLUENCIA DE N-ACETILCISTEINA (NAC) EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa in vitro*.-

Para evaluar la influencia de NAC en el proceso de la formación de biopelículas se utilizó el método de Friedman-Kolter.¹⁵ Tiene el mismo fundamento que el método utilizado por O'Toole-Kolter,³⁹ ya que ambos se basan en la tinción de las células por el colorante Cristal Violeta, siendo la única diferencia el solvente que utilizan para arrastrar la coloración captada por las biopelículas, antes utilizábamos el etanol absoluto, el cual no arrastra completamente el colorante captado, pero el dimetilsulfóxido sí lo hace. Es por este motivo que se decidió aplicar el método de Friedman-Kolter.¹⁵

Aunque se tenían referencias que N-acetilcisteína a la concentración de 0.5 mg/mL había tenido buenos resultados sobre las biopelículas *Staphylococcus epidermidis*, nosotros debíamos realizar pruebas preliminares para corroborar si efectivamente se obtendrían buenos resultados con esta concentración. Se trabajó con tres concentraciones 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL y con 1.0 mg/mL, pero

esta evaluación sólo se realizó durante la formación de biopelículas, obteniéndose como mejor concentración 1 mg/mL, ya que se podía observar una disminución del 50%.

Primero se revivificaron las cepas en 2 mL de TSB durante 10 hr de incubación a 37°C, luego se inocularon en las placas de poliestireno 1.5 mL de la dilución de cada una de las cepas con una densidad óptica (OD) de 0.005 a 600nm y se adicionó 1.0 mg/mL de NAC para incubarlos 30°C durante 4 días.

Transcurridas las primeras 48 hr se deshecho el sobrenadante y se lavaron los pocillos con 2 mL de SSF sólo por una vez y se adicionó 1.5 mL de TSB con la adición respectiva de NAC 1.0 mg/mL.

Luego se desechó el sobrenadante y se lavaron los pocillos con 2 mL de SSF por tres veces, se dejaron secar a TA. Se adicionó 2.0mL de solución de Cristal Violeta al 1% sobre cada uno de los pocillos y se incubó por 20 min a TA. Transcurrido este tiempo se lavaron los pocillos con 2 mL de agua destilada y se dejaron secar a TA.

Finalmente se agregó 2.0 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) y se incubó por 20 min a TA. Los tubos fueron leídos en la Lámpara de Luz Ultravioleta Termo Spectronic GENESYS 20 MODELO UV LAMP UV a 580nm. Se realizó un pocillo control para cada cepa, es decir un pocillo donde se formó la biopelícula por 96 hr pero sin la adición de la N-acetilcisteína, y se realizo un pocillo blanco. (FOTOGRAFÍA N° 3, N° 4, N° 5 Y N° 6)

3.6.- INFLUENCIA DE N-ACETILCISTEINA EN LA REMOCIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS DE *Pseudomona aeruginosa in vitro*.-

Cuando se produce la formación de las biopelículas y la producción del exopolisacárido, se forma una adhesión irreversible con la superficie o el tejido colonizado que es muy difícil de eliminar. De

acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación de la N-acetilcisteína durante la formación de las biopelículas con 1 mg/mL se decidió aplicar la misma concentración. Se escogieron dos métodos para realizar la cuantificación del exopolisacárido removido el método Friedman-Kolter¹⁵ y Olofsson y Col.³⁶ pero como aún no se tenía el tiempo necesario para que la NAC remueva parte del exopolisacárido presente se tuvo que realizar ensayos para determinar el tiempo adecuado.

Se realizaron ensayos con 2hr, 4hr y 6hr con el método de Friedman-Kolter¹⁵, obteniéndose mejores resultados con 6 hr de acción es por esto que se determinó trabajar con 6hr de acción de la NAC sobre las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*.

A.- Método de Friedman-Kolter¹⁵

Para comenzar la evaluación en esta etapa se revivificaron las cepas en 2 mL de TSB durante 10hr. a 37° C. Luego se inocularon en las placas de poliestireno 1.5 mL de la dilución de cada una las cepas con una OD igual a 0.005 a 600nm y se incubaron a 30° C durante 4 días.

Transcurridas las 48 hr se deshecho el sobrenadante y se lavaron los pocillos con 2 mL de SSF sólo por una vez y se adicionó 1.5 mL de TSB.

Terminadas las 96 hr. De incubación se desechó el sobrenadante y se lavaron los pocillos con SSF por una vez, para retirar las células adheridas, luego se colocó 1.5mL de SSF y se adicionó 1 mg/mL de NAC para incubarlas durante 6 hr. a TA.

Como siguiente paso se procedió a lavar los pocillos con 3 mL SSF por tres veces y se dejaron secar a TA, luego se adicionó 2.0 mL de solución de Cristal Violeta al 1% y se incubó por 20 min a TA.

Finalmente se lavaron tres veces los pocillos con 2 mL de agua destilada y se dejaron secar a TA, luego se agregó 2.0 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) y se incubó por 20 min a TA.

FOTOGRAFÍA Nº 3
CEPAS DE *P. aeruginosa* INCUBADAS
EN PLACAS DE POLYESTIRENO



FOTOGRAFÍA Nº 4
POCILLO BLANCO SIN INÓCULO,
SÓLO CONTIENE TSB



FOTOGRAFÍA Nº 5
POCILLO CONTROL SÓLO INÓCULO
NO HUBO PRESENCIA DE NAC



FOTOGRAFÍA Nº 6
RESULTADO DESPUÉS DE LA
ACCIÓN DE LA NAC



Los pocillos fueron leídos en la Lámpara de Luz Ultravioleta Termo Spectronic GENESYS 20 MODELO UV LAMP UV a 580nm. Se realizó un pocillo control para cada cepa trabajada y un blanco. Las pruebas fueron realizadas por duplicado. (FOTOGRAFÍA N°7)

B.- Método de Olofsson y Col.³⁶

Se revivificaron las cepas en 2 mL de TSB durante 10 hr. de incubación a 37° C luego se inoculó 1.5 mL de la dilución de cada una de las cepas de OD = 0.005 a 600nm en las placas de poliestireno para incubarlas a 30° C durante 4 días.

Transcurridas las 48 horas se deshecho el sobrenadante, se lavaron los pocillos con 2 mL de SSF sólo por una vez y se adicionó 1.5 mL de TSB.

Al término de las 96 hr. se desecho el sobrenadante y se lavaron los pocillos con SSF por una vez, para retirar las células adheridas, luego se colocó 1.5mL de SSF y se adicionó 1 mg/mL de NAC para incubarlas durante 6 hr. a TA.

El siguiente paso fué sonicar las placas de poliestireno por 30 seg. sin desechar el sobrenadante. Luego se trasvasó el sobrenadante de cada pocillo a otros tubos, se adicionó sobre cada uno de los tubos 1 mL de etanol absoluto frío y se incubó a 4° C por 12 hr.

Transcurrido ese tiempo se procedió a centrifugar los tubos a 3000rpm por 15min, se deshecho el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de agua destilada.

Luego se adicionó 7 mL de ácido sulfúrico (77%) y se dejó en baño de hielo por 10 min. inmediatamente se adicionó 1 mL de triptófano frío (1% peso / peso) y se incubó en Baño María a 100° C por 20 minutos. Finalmente se enfrió en baño de hielo y los tubos fueron leídos en la Lámpara de Luz Ultravioleta Termo Spectronic GENESYS 20 MODELO UV LAMP UV a 500nm.

Se realizó un blanco con agua destilada pero sometido a las mismas condiciones que las muestras, para descontar la coloración producida por el reactivo. (FOTOGRAFÍA N° 8)

FOTOGRAFÍA N° 7

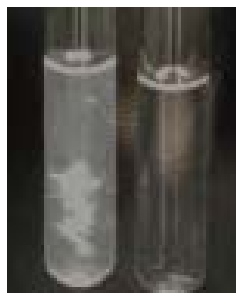
MÉTODO DE FRIEDMAN-KOLTER



Se cuantificaron las cepas resistentes a la acción de la NAC

FOTOGRAFÍA N° 8

METODO DE OLOFSSON



III.- RESULTADOS

1.- RECOLECCION DE MUESTRAS

Se recolectaron 62 cepas de líquidos y secreciones biológicas de pacientes de diferentes servicios del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins durante el período de Enero a Setiembre del 2006 (ANEXO 2 Procedencia de las cepas Recolectadas)

2.- IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Las cepas aisladas fueron analizadas por el laboratorio de Microbiología del Hospital Edgardo Rebagliati Martins analizadas con Paneles de MICROESCAN obteniéndose resultados positivos para *Pseudomonas aeruginosa*. (TABLA N°4)

En la corroboración de la identificación de las cepas aisladas se obtuvieron los siguientes resultados: la Tinción Gram de cada una de las cepas se confirmó la presencia de un cultivo puro de bacilos alargados gram negativos, propios de la especie *P. aeruginosa*, todos los aislamientos clínicos crecieron en agar Cetrimide con la producción de un pigmento verdoso característico de esta especie en este medio. (FOTOGRAFÍA N° 9)

Después de 24 h de incubación a 37°C en agar Mac Conkey, las cepas mostraron un buen crecimiento y desarrollaron colonias de color blanco debido a que esta especie carece de la enzima para utilizar la lactosa presente en el medio de cultivo (FOTOGRAFÍA N° 10).

TABLA N° 4
IDENTIFICACIÓN POSITIVA PARA *Pseudomonas aeruginosa*
POR PANELES MICROSCAN

RESULTADOS DE LOS PANELES DE MICROSCAN®					
Pruebas	Resultados	Pruebas	Resultados	Pruebas	Resultados
GLU	-	IND	-	ACE	+ ¹
SUC	-	LYS	-	CET	+
SOR	-	ARG	+	OF/G	V
RAF	-	ORN	-	OF/B	Azul verdoso
RHA	-	TDA	-	P4	+
ARA	-	ESC	-	NIT	V
INO	-	VP	- ²	CL4	-
ADO	-	CIT	+	Fd64	+
MEL	-	MAL	+	Cf8	+
URE	V	ONPG	-	K4	+
H2S	-	TAR	V	To4	-

Abreviaturas: Fermentación de Carbohidratos (GLU, SUC, SOR, RAF, RHA, ARA, INO, ADO, MEL); Urea (URE); Sulfuro de hidrógeno (H2S); Indol (IND); Lisina, Arginina, Ornitina (LYS, ARG, ORN); Triptófano desaminasa (TDA); Hidrólisis de esculina (ESC); Voges-Proskauer (VP); Galactosidasa (ONPG); Citrato, malonato, acetamida, tartrato (CIT, MAL, ACE, TAR); Oxidación-Fermentación (OF/G); Oxido Fermentación Base (OF/B); Nitrato (NIT); Cetrimida (CET); Penicilina, Kanamicina, Colistina, Cefalotina, nitrofurantoína, tobramicina (P4, K4, CL4, Cf8, Fd64, To4).

(1) Puede necesitar 48 horas de incubación.

(2) *Pseudomona aeruginosa* puede producir un color rosa pálido en VP después de 18 horas de incubación lo que se debe interpretar como negativo.

(v) Puede ser positivo o negativo.

TABLA N° 5
CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE
Pseudomonas aeruginosa

Pruebas	Resultados
Coloración de Gram	Bacilos gram-negativos, alargados.
Siembra en agar hierro de kligler	Imagen alcalina de color rojo en todo el tubo, SH ₂ negativo, gas Negativo.
Siembra en agar Cetrimide	Colonias redondas, lisas, de bordes regulares. Producción de pigmento verde (pioverdina)
Siembra en Mac Conkey	Colonias redondas, incoloras por no utilización de la lactosa.

FOTOGRAFÍA Nº 9

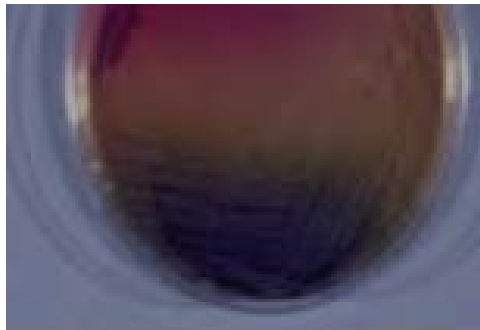
AGAR CETRIMIDE



Los aislamientos clínicos crecieron con la producción de un pigmento verdoso característico de esta especie en este medio; el cual es específico para esta especie.

FOTOGRAFÍA Nº 10

AGAR MAC CONKEY



Las cepas desarrollaron colonias de color blanco.

En el medio agar hierro de Kligler (KIA) todos los aislamientos clínicos mostraron una imagen con superficie y fondo alcalino por la producción de aminas a partir de las peptonas que componen el medio, característico de organismos no fermentadores, no produjo gas, ni sulfuro de hidrógeno. (TABLA N° 5). Se confirmó el 100% de las cepas aisladas de diferentes servicios del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins como cepas de la especie de *Pseudomonas aeruginosa*.

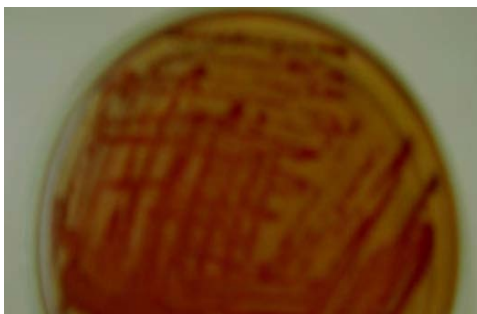
3.- SELECCION DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS.-

Se observó que el 42 % de las cepas recolectadas de *Pseudomonas aeruginosa* desarrollaron colonias rojas oscuras sobre el Agar Rojo de Congo, característica de las bacterias formadoras de biopelículas (FOTOGRAFÍA N° 11 Y N° 12); mientras que el 13 % de las cepas restantes desarrollaron colonias ligeramente rosadas (FOTOGRAFÍA N° 13) y el 45 % desarrollaron colonias blanquecinas, característica de las bacterias no formadoras de biopelículas. (GRAFICO 1)

Como control negativo (FOTOGRAFÍA N° 14) se utilizó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (cepa no formadora de biopelícula), la cual desarrollo colonias blanquecinas sobre el Agar Rojo de Congo (TABLA N° 6 y N°7).

FOTOGRAFÍA Nº 11

***Pseudomonas aeruginosa* FORMADORA DE BIOPELÍCULA (BFB-12)**



Crecimiento de colonias rojas oscuras sobre el Agar Rojo de Congo

FOTOGRAFÍA Nº 12

***Pseudomonas aeruginosa* FORMADORA DE BIOPELÍCULA (BFB-14)**



Crecimiento de colonias rojas oscuras con pigmentación verde

FOTOGRAFÍA N° 13

BACTERIA NO FORMADORA DE BIOPELÍCULA (BNFB)



Crecimiento de colonias ligeramente rosadas sobre el Agar Rojo de Congo

FOTOGRAFÍA N° 14

METODO AGAR ROJO DE CONGO *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



Crecimiento de colonias blanquecinas sobre el Agar Rojo de Congo

GRAFICO N° 1

PORCENTAJE DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS

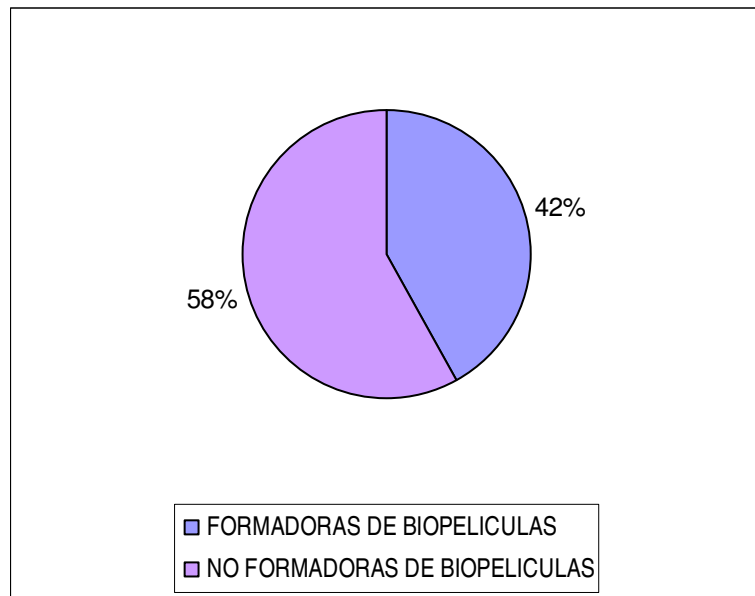


GRAFICO N° 2

INFLUENCIA DE LA N-ACETILCISTEINA DURANTE LA FORMACION Y REMOCION DEL EXOPOLISACÁRIDO PRESENTE DE LAS BIOPELÍCULAS DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROCEDENTES DEL HOSPITAL NACIONAL EDGARDO REBAGLIATI MARTINS

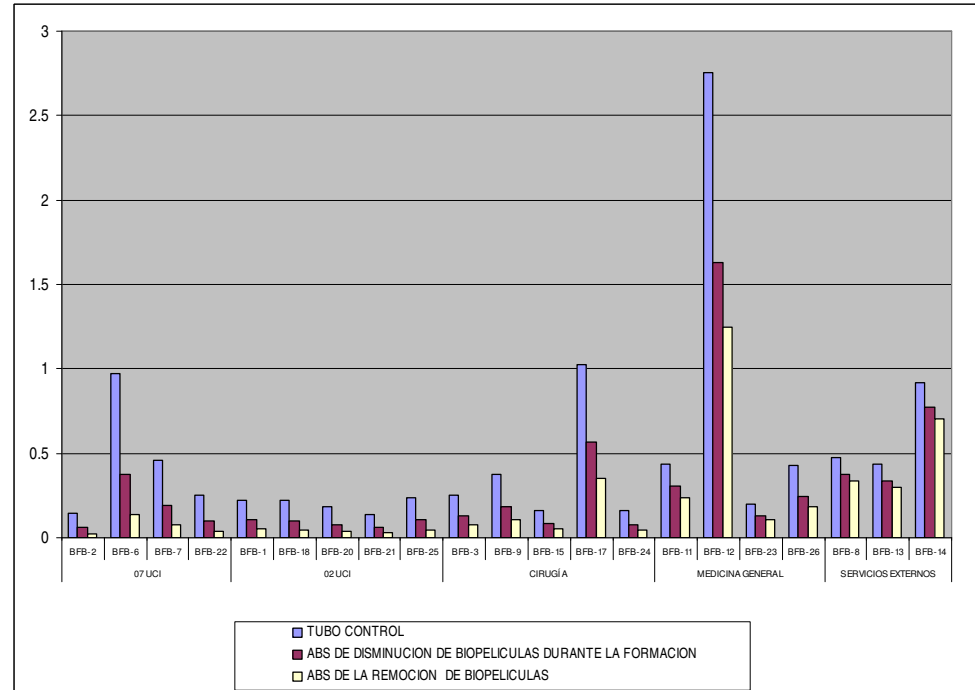


TABLA Nº 6

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS

CEPAS	CRECIMIENTO EN AGAR ROJO DE CONGO	COLONIAS ROJAS OSCURAS	COLONIAS LIGER. ROSADAS	COLONIAS BLANQUECINAS	CARACTERIS BACTERIANA
ATCC 9027	+	-	-	+	BNFB
CEPA 1	+	+	-	-	BFB-1
CEPA 2	+	-	+	-	BNFB
CEPA 3	+	-	+	-	BNFB
CEPA 4	+	+	-	-	BFB-2
CEPA 5	+	+	-	-	BFB-3
CEPA 6	+	+	-	-	BFB-4
CEPA 7	+	-	-	+	BNFB
CEPA 8	+	+	-	-	BFB-5
CEPA 9	+	-	-	+	BNFB
CEPA 10	+	+	-	-	BFB-6
CEPA 11	+	-	-	+	BNFB
CEPA 12	+	-	-	+	BNFB
CEPA 13	+	+	-	-	BFB-7
CEPA 14	+	+	-	-	BFB-8
CEPA 15	+	+	-	-	BFB-9
CEPA 16	+	+	-	-	BFB-10
CEPA 17	+	+	-	-	BFB-11
CEPA 18	+	+	-	-	BFB-12
CEPA 19	+	-	-	+	BNFB
CEPA 20	+	+	-	-	BFB-13
CEPA 21	+	-	-	+	BNFB
CEPA 22	+	+	-	-	BFB-14
CEPA 23	+	-	+	-	BNFB
CEPA 24	+	+	-	-	BFB-15
CEPA 25	+	-	-	+	BNFB
CEPA 26	+	+	-	-	BFB-16
CEPA 27	+	+	-	-	BFB-17
CEPA 28	+	-	-	+	BNFB
CEPA 29	+	-	-	+	BNFB
CEPA 30	+	-	-	+	BNFB
CEPA 31	+	-	-	+	BNFB

(BNFB) Bacteria no formadora de Biopelícula

(BFB) Bacteria Formadora de Biopelícula

(+) Resultado positivo.

(-) Resultado Negativo.

TABLA Nº 7

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS

CEPAS	CRECIMIENTO EN AGAR ROJO DE CONGO	COLONIAS ROJAS OSCURAS	COLONIAS LIGER. ROSADAS	COLONIAS BLANQUECINAS	CARACTERIS BACTERIANA
CEPA 32	+	-	-	+	BNFB
CEPA 33	+	-	-	+	BNFB
CEPA 34	+	-	-	+	BNFB
CEPA 35	+	-	-	+	BNFB
CEPA 36	+	-	-	+	BNFB
CEPA 37	+	-	-	+	BNFB
CEPA 38	+	-	-	+	BNFB
CEPA 39	+	-	-	+	BNFB
CEPA 40	+	-	-	+	BNFB
CEPA 41	+	-	-	+	BNFB
CEPA 42	+	-	+	-	BNFB
CEPA 43	+	+	-	-	BFB-18
CEPA 44	+	-	+	-	BNFB
CEPA 45	+	+	-	-	BFB-19
CEPA 46	+	-	+	-	BNFB
CEPA 47	+	+	-	-	BFB-20
CEPA 48	+	+	-	-	BFB-21
CEPA 49	+	+	-	-	BFB-22
CEPA 50	+	-	+	-	BNFB
CEPA 51	+	-	-	+	BNFB
CEPA 52	+	-	-	+	BNFB
CEPA 53	+	-	-	+	BNFB
CEPA 54	+	-	-	+	BNFB
CEPA 55	+	+	-	-	BFB-23
CEPA 56	+	-	+	-	BNFB
CEPA 57	+	+	-	-	BFB-24
CEPA 58	+	-	-	+	BNFB
CEPA 59	+	+	-	-	BFB-25
CEPA 60	+	-	-	+	BNFB
CEPA 61	+	-	-	+	BNFB
CEPA 62	+	+	-	-	BFB-26

(BNFB) Bacteria no formadora de Biopelícula

(BFB) Bacteria Formadora de Biopelícula

(+) Resultado positivo.

(-) Resultado Negativo.

4.- SELECCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE MAYOR CANTIDAD DE BIOPELÍCULAS.-

Se evaluaron las 62 cepas aisladas las cuales desarrollaron una película fina blanquecina en la interfase líquido-aire adherida a la pared de los tubos, las cuales se tiñeron al agregar el indicador Cristal Violeta al 1 %, esta coloración fue proporcional a la cantidad de biopelícula formada por cada cepa, obteniéndose un 81% de cepas formadoras de biopelículas, presentando valores mayores a 0.140 de densidad óptica y llegando hasta 2.567 en la cuantificación por el método de O'Toole-Kolter³⁹, es importante mencionar que la incubación se realizó durante 96hr (FOTOGRAFÍA Nº 15, Nº 16, Nº17 Y Nº 18 TABLA Nº 8).

5.- INFLUENCIA DE N-ACETILCISTEINA EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa in vitro*.-

La evaluación de la acción de la N-acetilcisteína durante la formación de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó durante 96 horas de acción a la concentración de 1 mg/mL, observándose resultados de disminución desde 39% hasta el 84%. (TABLA Nº 9)

6.- INFLUENCIA DE N-ACETILCISTEINA SOBRE LAS BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa in vitro* .-

Los resultados obtenidos en la evaluación de la acción de la N-acetilcisteína sobre las biopelículas formadas de *Pseudomonas aeruginosa* por el Método de Friedman-Kolter¹⁵ fueron realmente favorables obteniéndose 14% como mínimo porcentaje y 76% como máximo porcentaje de la remoción del exopolisacárido. (TABLA Nº 10 Y GRAFICO 2)

Con el Método de Olofsson y Colaboradores³⁶ no se obtuvieron resultados.

FOTOGRAFÍA N° 15

Pseudomonas aeruginosa BFB-9



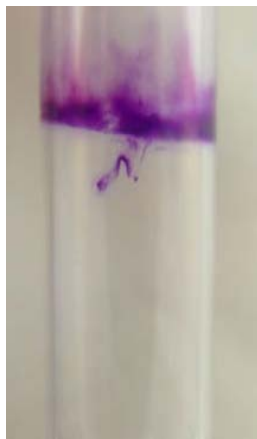
FOTOGRAFÍA N° 16

Pseudomonas aeruginosa BFB-12



FOTOGRAFÍA N° 17

Pseudomonas aeruginosa BFB-2



FOTOGRAFÍA N° 18

Pseudomonas aeruginosa BFB-5



TABLA Nº 8

Pseudomonas aeruginosa FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS

BACTERIAS	ABSORBANCIA			PROMEDIO
	1	2	3	
BFB-1	0.251	0.249	0.253	0.251
BFB-2	0.153	0.157	0.15	0.153
BFB-3	0.267	0.278	0.272	0.272
BFB-4	0.081	0.077	0.081	0.080
BFB-5	0.099	0.097	0.105	0.100
BFB-6	0.953	0.947	0.941	0.947
BFB-7	0.463	0.451	0.458	0.457
BFB-8	0.482	0.487	0.481	0.483
BFB-9	0.386	0.384	0.397	0.389
BFB-10	0.106	0.101	0.099	0.102
BFB-11	0.452	0.461	0.459	0.457
BFB-12	2.562	2.571	2.569	2.567
BFB-13	0.451	0.463	0.458	0.457
BFB-14	0.934	0.951	0.947	0.944
BFB-15	0.159	0.174	0.167	0.167
BFB-16	0.095	0.085	0.093	0.091
BFB-17	1.034	1.039	1.028	1.034
BFB-18	0.191	0.197	0.201	0.196
BFB-19	0.097	0.095	0.087	0.093
BFB-20	0.191	0.197	0.201	0.196
BFB-21	0.139	0.147	0.142	0.143
BFB-22	0.267	0.257	0.254	0.259
BFB-23	0.198	0.206	0.203	0.202
BFB-24	0.153	0.157	0.163	0.158
BFB-25	0.239	0.248	0.224	0.237
BFB-26	0.437	0.439	0.431	0.436

Bacterias formadoras de mayor cantidad de biopelículas

Bacterias formadoras de menor cantidad de biopelículas

TABLA N° 9

INFLUENCIA DE N-ACETILCISTEINA EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa in vitro*

SERVICIO	BACTERIAS	ABS DEL TUBO CONTROL	ABS MUESTRA 1	ABS MUESTRA 2	PROMEDIO	% DE BIOPELIC. FORMADAS	% DE INHIBICIÓN
07 UCI	BFB-2	0.146	0.087	0.083	0.085	58.22	41.78
	BFB-6	0.972	0.598	0.6	0.599	61.63	38.37
	BFB-7	0.458	0.259	0.278	0.2685	58.62	41.38
	BFB-22	0.256	0.16	0.151	0.1555	60.74	39.26
02 UCI	BFB-1	0.225	0.123	0.12	0.1215	54	46
	BFB-18	0.22	0.129	0.119	0.124	56.36	43.64
	BFB-20	0.183	0.111	0.097	0.104	56.83	43.17
	BFB-21	0.135	0.071	0.074	0.0725	53.7	46.3
	BFB-25	0.236	0.134	0.127	0.1305	55.3	44.7
CIRUGÍA	BFB-3	0.252	0.126	0.117	0.1215	48.21	51.79
	BFB-9	0.375	0.19	0.185	0.1875	50	50
	BFB-15	0.16	0.079	0.069	0.074	46.25	53.75
	BFB-17	1.029	0.458	0.474	0.466	45.29	54.71
	BFB-24	0.16	0.075	0.085	0.08	50	50
MEDICINA GENERAL	BFB-11	0.439	0.129	0.138	0.1335	30.41	69.59
	BFB-12	2.754	1.106	1.136	1.121	40.7	59.3
	BFB-23	0.202	0.072	0.066	0.069	34.16	65.84
	BFB-26	0.425	0.175	0.185	0.18	42.35	57.65
SERVICIOS EXTERNOS	BFB-8	0.477	0.096	0.101	0.0985	20.65	79.35
	BFB-13	0.434	0.093	0.1	0.0965	22.24	77.76
	BFB-14	0.919	0.145	0.151	0.148	16.1	83.9

TABLA N° 10

INFLUENCIA DE N-ACETILCISTEINA EN LA REMOCIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa in vitro*

SERVICIO	BACTERIAS	ABS CONTROL	ABS MUESTRA 1	ABS MUESTRA 2	PROMEDIO	% DE BIOPELIC. FORMADAS	% DE INHIBICIÓN
07 UCI	BFB-2	0.146	0.123	0.117	0.12	82.19	17.81
	BFB-6	0.972	0.843	0.831	0.837	86.11	13.89
	BFB-7	0.458	0.386	0.379	0.3825	83.52	16.48
	BFB-22	0.256	0.221	0.217	0.219	85.55	14.45
02 UCI	BFB-1	0.225	0.175	0.168	0.1715	76.22	23.78
	BFB-18	0.22	0.182	0.172	0.177	80.45	19.55
	BFB-20	0.183	0.151	0.141	0.146	79.78	20.22
	BFB-21	0.135	0.099	0.106	0.1025	75.93	24.07
	BFB-25	0.236	0.184	0.191	0.1875	79.45	20.55
CIRUGÍA	BFB-3	0.252	0.171	0.174	0.1725	68.45	31.55
	BFB-9	0.375	0.258	0.271	0.2645	70.53	29.47
	BFB-15	0.16	0.103	0.112	0.1075	67.19	32.81
	BFB-17	1.029	0.677	0.671	0.674	65.5	34.5
	BFB-24	0.16	0.112	0.118	0.115	71.88	28.13
MEDICINA GENERAL	BFB-11	0.439	0.208	0.198	0.203	46.24	53.76
	BFB-12	2.754	1.504	1.513	1.5085	54.77	45.23
	BFB-23	0.202	0.096	0.1	0.098	48.51	51.49
	BFB-26	0.425	0.241	0.237	0.239	56.24	43.76
SERVICIOS EXTERNOS	BFB-8	0.477	0.141	0.137	0.139	29.14	70.86
	BFB-13	0.434	0.126	0.139	0.1325	30.53	69.47
	BFB-14	0.919	0.208	0.219	0.2135	23.23	76.77

IV.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.-

Una de las mejores maneras para determinar la presencia de biopelículas de una especie es por el exopolisacárido que se produce, por lo que para evaluar la capacidad de formar biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* fue necesario utilizar dos métodos: el Agar rojo de Congo,¹⁵ que se utiliza para detectar la presencia del exopolisacárido en bacilos acuosos Gram negativos, y el método del tubo que se fundamenta en la tinción de las células y exopolisacárido presente.

Los resultados obtenidos fueron del 42% de cepas formadoras de biopelículas con el Agar Rojo de congo y 50% con el método del tubo. Esta diferencia de resultados que se observa se puede deber a la sensibilidad del método, ya que el método del tubo puede tomar como resultado positivo a aquellas cepas que presentan mejor adhesión sobre las superficies, pero esto no quiere decir que sean formadoras de biopelículas, es por esta razón que nosotros diferimos con Mathur et al.³⁰ quien investigó tres métodos para la identificación de biopelículas, y determinó que el método mas sensible, exacto y reproducible aplicado para la cepas de *Staphylococcus spp.* era el método del Tubo comparado contra el método del Agar Rojo de Congo (ARC), y el método de Cultivo en Placa, para nosotros el método ARC es mas rápido sensible y reproducible, y además tiene la ventaja de recuperar las colonias viables.

Como Olofsson y colaboradores determinaron que la N-acetilcisteína podía servir como un candidato interesante para reducir y prevenir la formación de biopelículas sobre superficies inertes en las fábricas de papel³⁶ y Marchese y colaboradores habían evaluado el efecto inhibitorio que presenta la fosfomicina en comparación con la asociación de fosfomicina y NAC en biopelículas de *Escherichia coli*, determinando que la acción de dicha asociación tenía un mayor efecto inhibitorio que la

fosfomicina sola,²⁹ se decidió evaluar la influencia de este mucolítico sobre las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. Para obtener buenos resultados y analizar esta influencia se escogieron las cepas que producían mayor cantidad de biopelículas, realizándose la cuantificación por el método Friedman and Kolter.¹⁵ Este método nos ayudó a cuantificar las biopelículas formadas con la coloración del cristal violeta. A pesar que todas producían biopelículas y pertenecían a la misma especie presentaron diferencias en la formación de biopelículas, observándose claramente la mayor producción de biopelículas en el 81% de total de las cepas analizadas, esta diferencia se podría deber a la gran variabilidad genética que existe entre distintos aislamientos de esta bacteria aun siendo aislada en la misma región.

Se logró inducir la formación de biopelículas de las cepas recolectadas de pacientes de diferentes servicios del hospital Edgardo Rebagliati Martins durante 96hr, el material escogido para esta investigación fueron las placas de poliestireno, ya que presentan mayor porosidad que el propileno ayudando a que la formación de biopelículas se realice más rápido. Se observó influencia negativa de la N-acetilcisteína durante la formación de biopelículas, a pesar que se trabajó de la misma manera y bajo las mismas condiciones los resultados obtenidos fueron diferentes para cada una de ellas es por esto que se decidió agrupar los resultados los resultados obtenidos de acuerdo a los servicios de donde fueron aislados: en el 19% de las cepas aisladas se obtuvo una disminución del 40% y en el 24% se obtuvo una disminución del 45% en la formación de biopelículas, estas cepas fueron aisladas de líquidos biológicos de pacientes de Cuidados Intensivos de dos pisos diferentes, del piso 7 y 2 respectivamente. Los pacientes internados en esta área se encuentran sometidos a una farmacoterapia agresiva, ya que se encuentran inmunocomprometidos y son blanco fácil para cualquier infección y por ende las bacterias encontradas presentaron mayor resistencia a la acción de la NAC. En las cepas recolectadas del servicio de Cirugía que representan el 24% del total se encontró una disminución significativa del 52%, mientras que en las cepas recolectadas de Medicina General

que representan el 19 % se obtuvo una disminución del 63% y en el 14% restante de cepas recolectadas de los diferentes servicios se obtuvo una disminución del 80%. Estos resultados obtenidos no son muy diferentes a los resultados obtenidos por Perez-Giraldo y colaboradores cuando obtuvieron una disminución significativa del 53% de la formación de biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* bajo la acción de la NAC a una concentración de 1mg/mL.⁴²

Con estos resultados se demuestra que la NAC disminuye la formación de biopelículas de *Pseudomona aeruginosa*, aunque aún no se conoce el mecanismo por el cual ejerce su acción, se puede pensar que su acción esta relacionada con la adherencia de las células, la presencia de este mucolítico evita la adherencia de estas células, evitando de esta manera la fase de inicio de la formación de las biopelículas.

Como se demostró la influencia negativa sobre la formación de las biopelículas se trabajó con la misma concentración para la evaluación de la influencia de la N-acetilcisteína sobre la remoción del exopolisacárido, pero se sabe que mientras mas tiempo tenga de formadas las biopelículas resulta mas difícil su erradicación, ya que la capa de exopolisacárido que forman es mas resistente, mas gruesa y además ya se empezó la colonización de otras superficies cercanas. Es por esto que se realizaron pruebas preliminares con dos 2hr, 4 hr y 6hr obteniéndose como mejor tiempo de acción 6hr para evaluar la influencia de la N-acetilcisteína.

Se indujo la formación de las biopelículas de acuerdo en las placas de poliestireno, aunque no se conoce el mecanismo de acción se cree que la NAC rompe los enlaces del exopolisacárido liberando de esta manera pedazos o cadenas de esta matriz extracelular. El polisacárido liberado puede ser cuantificado por el Método de Olofsson y colaboradores,³⁶ que cuantifica directamente el exopolisacárido o se puede calcular de manera inversa cuantificando las biopelículas resistentes por el

Método de Friedman and Kolter¹⁵, pero en este caso no se pudo cuantificar directamente el exopolisacárido liberado, ya que la cantidad no fue detectada, es por esto que se utilizó el otro método cuantificando las cepas que resistieron a la acción de la NAC, y de esta manera se pudo determinar el % de degradación de biopelículas.

En el 19% y el 24% de las cepas aisladas se obtuvo una degradación del 16% y 22% respectivamente en las biopelículas formadas, estas cepas fueron aisladas de líquidos biológicos de pacientes del área de Cuidados Intensivos de dos pisos diferentes, del piso 7 y 2 respectivamente. Si comparamos estos resultados con los obtenidos durante la formación de biopelículas podemos corroborar la condición presentada por los pacientes y las cepas aisladas presentan mayor resistencia, al observar la disminución con respecto a la influencia que ejerce la N-acetilcisteína durante la formación de estas biopelículas se sabe que esto se debe a que la biopelícula ya tiene cuatro días de formación y por lo tanto se empezó la unión irreversible a la superficie. En las cepas recolectadas del área de Cirugía que representan el 24% se encontró una degradación significativa del 31%, mientras que en las cepas recolectadas del área de Medicina General que representan el 19 % del total se obtuvo una degradación del 49% y en el 14% restante de cepas recolectadas de los diferentes servicios se obtuvo una degradación de biopelículas del 72%.

Es clara la diferencia presentada de la acción de NAC en las dos fases de desarrollo de biopelículas, primero cuando empieza la adherencia y la formación, y luego cuando la biopelícula ya fue formada, no es aún conocido el mecanismo de acción de NAC sobre biopelículas de *Pseudomona aeruginosa* , pero se conoce que la NAC tiene un mecanismo mucocinético que se basa en la ruptura de puentes disulfuro las cuales enlazan las fibras de polisacáridos, sabemos que las biopelículas están formadas de polisacáridos y la NAC podría estar actuando de la misma manera.

Los resultados muestran que la NAC disminuye la formación y degrada las biopelículas formadas por *Pseudomonas aeruginosa*, este mucolítico puede ser utilizado quizás como una alternativa efectiva para prevenir la infección por esta bacteria. Sería importante tomar en cuenta para la farmacoterapia de pacientes con fibrosis quística la adición de NAC, ya que existe en estos pacientes resistencia a los antibióticos, que puede ser porque el antibiótico falla en la penetración a través de las biopelículas, de tal manera no pueden ejercer acción sobre las bacterias o cuando el antibiótico llega a penetrar las biopelículas, las células presentes en la base de las biopelículas no se encuentran en fase logarítmica porque existe limitación del oxígeno evitando o retardando el crecimiento de las células. Antibióticos como Ciprofloxacino y Oxofloxacino penetran en las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* mientras que la Gentamicina y Tobramicina tienen penetración retardada,⁴⁹ es por esto que resulta importante su utilización en la farmacoterapia contra la fibrosis quística y sería importante su aplicación en industrias tecnológicas donde podrían existir posibilidades de desarrollo de biopelículas.

V.- CONCLUSIONES

- Se aislaron 62 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de líquidos biológicos y heridas de pacientes del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.
- El 42% de las cepas hospitalarias recolectadas de *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de formar biopelículas bajo condiciones adecuadas. Se utilizó el Método del Agar Rojo de Congo, que es un método altamente sensible, rápido y reproducible para la identificación de cepas formadoras de biopelículas, ya que se puede observar las diferencias en la forma, color y características de las colonias desarrolladas.
- La N-acetilcisteína a la concentración de 1mg/ml disminuye la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* cuando esta es aplicada sobre la superficie abiótica antes que se inicie del proceso de formación, se obtuvo disminuciones hasta el 84% lo que sugiere las bondades de este mucolítico en el control de biopelículas en la primera etapa de formación.
- La N-acetilcisteína remueve la matriz exopolimérica de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* en diferentes proporciones, dependiendo del fenotipo de cada cepa, obteniéndose resultados de hasta el 77% de remoción con 6 horas acción, esto nos abre una nueva posibilidad de sustancia a utilizar para controlar la formación de biopelículas tanto en superficies bióticas como abióticas y controlar la resistencia que presentan frente a los antibióticos.

VI.- RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con los estudios de bacterias formadoras de biopelículas orientados a descubrir sustancias que eviten o disminuyan su formación, así como su eliminación de las superficies bióticas o abióticas susceptibles a contaminación. Se considera importante investigar otras sustancias como el EDTA, el citrato de sodio o el cloruro de sodio sobre la formación de biopelículas tanto de *Pseudomonas aeruginosa* como otras bacterias, así como también evaluar la influencia que puede ocasionar la N-acetilcisteína sobre las biopelículas bacterianas. Sería importante también dirigir esta investigación a buscar materiales repelentes a la adhesión y que no aporten nutrientes, formular biocidas y diseñar sistemas para asegurar su completa eliminación.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Betancourth, M., Botero, J. E. and Rivera, S. P. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. Colombia médica 2004; 35 (3): (Supl 1)
2. Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V., Jadeja, L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis. 5(2): 279-313
3. Burrows, L. L., Charter, D. F. and Lam, J. S. Molecular characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 (PAO1) B-band lipopolysaccharide gene cluster. Mol. Microbiol. 1996; 22: 481-495
4. Caldwell, D.E. Cultivación and study of biofilm communities. In H.M. Lappin Scott and J.W. Costerton (ed), Microbial biofilms. University Press, Cambridge, U.K. 1995; 64- 79
5. Costerton, J.W. Biofilms: the customized microniche. J Bacteriology. 1994; 176: 2137-42
6. Costerton, J.W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol. 1987; 41: 435-64.
7. Costerton, J.W., Stewart, P.S. Battling Biofilms. Scientific American. 285(1):74-81
8. Costerton, J. W. Overview of microbial biofilm. J. Indus Microbiol. 1995; 15: 137-140
9. Davey, M. E., and O'Toole, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64: 847-867.
10. De Kievit, T. R. and Iglewski, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. Infection and Immunity. 2000; 68: 4839-49
11. Donlan, R. Biofilms: Microbial Life on Surfaces Emerg. Infect. Dis 2002 8(9) Center for Disease Control and Prev. (CDC)
12. Donlan, R. M., and Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews 2002; 15(2): 167-93.
13. Dunne, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilm Lately ?. Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(2): 155-166

14. Enciclopedia libre. <http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>
15. Friedman, L. and Kolter, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*. 2004; 51(3): 675-90
16. Frantz, B. and Chakrabarty, A. M., Degradative plasmids in *Pseudomonas*. 1986; 295-325.
17. Gordon, C. A., Hodges, N. A., and Marriott, C. Use of slime dispersants to promote antibiotic penetration through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991; 35: 1258-60.
18. Govan, J.R. and Deretic, D. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60: 539-574.
19. Hardalo, C. and Edberg, S. C. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol*. 1997; 23: 47-75
20. Heitz, E., Sand, W. and Flemming, H. C. Microbially influenced corrosion of material-Scientific and technological aspects, Springer, Heidelberg. 1996; 39-54.
21. Herrera, M. T. Biofilm, infección, resistencia y tratamiento. *Nova Enero-Diciembre*. Bogota-Colombia 2004 Vol. 2 Numero 002
22. Kim, Lewis. Minireview Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; p. 999–1007
23. Landa, A.S. Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm. *Adv Dent Res* 2004; 11: 528-38.
24. Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penadés, J. R. and Leiva, J. Bacterial biofilms and infection. *Anales Sist. Sanit. Navar*. Mayo-Agosto 2005; 28 (Nº 2).
25. Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N. and Lazdunski, A. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol*. 2003; 48: 199-210

26. Liang, X., Pham, X., Olson, M. and Lory, S. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2000; 183: 843-853
27. Mah, T. and O'Toole, G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. TMS 2001; 9: 34-39
28. Maier, M. R. and Soberón-Chávez, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000.; 54: 625-633
29. Marchese, A., Bosolasco, M., Gualdo, L., Debia, E., Schito, G., Schito, M. 2003. Effect of fosfomicin alone and in combination with N-actylcysteine on *E. coli* biofilm. Antimicrobial Agents 22:95-100
30. Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T. and Rattan, A. Detection of biofilm formation among the clinical insulates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. Indian Journal of Medical Microbiology. 2006; 24(1): 25-29.
31. Mayette 1992, en www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=143
32. Medina, G., Juárez, K., Díaz, R., and Soberón-Chávez, G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhIR* encoding a quorum sensing regulatory protein. Microbiol sometido 2003
33. Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J.B. and Costerton J. W. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. Antimic. Agents Chemoth. 1985; 27: 619-624.
34. Nikaido, H., Okusu, D. , and Li, Z. Multidrug efflux pumps make a major contribution to drug resistance in *Pseudomonas*. 1996; 353-362.
35. Olivera, E. R., Cenicero, D., Jodra, R., Minambres, B., García, B. et al. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. Environ. Microbiol. 2001; 3: 612-18.
36. Olofsson, A., Hermansson, M. and Elwing, H. N - Acetyl-L- Cysteine Affects Growth,

- Extracellular Polysaccharide Producción, and Bacterial Biofilm Formation on Solid Surfaces. Applied and Environmental Microbiology. Aug. 2003; 69(8): 4814-22.
37. Olvera, C., Goldberg, J. B., Sánchez, R. and Soberón-Chávez, G. *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipids biosynthesis. FEMS Microbiol. Lett. 1999; 71: 85-90
38. O'Toole., Biofilm formation as microbial development. Annu Rev. Microbiol. 2000; 54:49-79
39. O'Toole, G. and Kolter, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology. 1998; 28(3), 449-461
40. O'Toole, G. A., Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol. 30(2): 295-304
41. Pedersen, Suecia 1990, en www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=143
42. Perez-Giraldo, C., Rodríguez-Benito, A., Moran, F.J., Hurtado, C., Blanco, M. T., Gomez-García, A. C. 1997. Influence of N-Acetylcysteína on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. J. Antimicrob. Chemother. 39: 643 - 646
43. Pesci, E. C. and Iglewski, W. H. The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. Trends Microbiol. 1997; 5: 132-135
44. Quirynen, M., and Bollen C.M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol 1995; 22: 1-14.
45. Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. and Greenberg, E. P. Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum controlled genes: a transcriptome analysis. J. Bacteriol. 2003; 185: 2066-2079.
46. Singh, P. K., M. R. Parsek, E. P. Greenberg and J. Welsh. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature. 2002; 917: 552-555

47. Soberón-Chávez, G., Haïdour, A., Ramos, J. L., Campos, J., and Ortigoza, J. Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing some isomers in a branched-chain dodecylbenzene sulfonate mixture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1996;12: 367-372.
48. Socransky, S.S. and Haffajee, A. D., Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontol 2000* 2003; 3: 12-55.
49. Spoering, A. and Lewis, K. Biofilm and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to Killing by Antimicrobials. *Journal of Bacteriology.* 2001; 6746-6751
50. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. and Costerton, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 187-209.
51. Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara, M., Debarbouille, M., Penades, JR. and Lasa, I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative ica independent biofilm in the absence of arlRS two-component System. *J. Bacteriol* 2005
52. Valle, J., Toledo- Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J., Amorena, B. and Penades, B. et al. Sar A and not 6B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1075-1087.
53. Whitchurch, C. B., Alm, R. A. and Mattick, J. S. The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 9839-43.
54. Whitchurch, T., Hobbs, M., Livingston, S. P., Krishnapilai, V and Mattick, J. S. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for specialized protein export system widespread in bacteria. *Gene* 1991; 100: 33-44.
55. Whiteley, M., Kimberly, M. L. and Greenberg, E. P. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:13904-09
56. Xu, K. D. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 2000-2004; 146: 547-9

VIII.- GLOSARIO

- **“Biofouling”**.- Es la contaminación producida por la actividad microbiana sobre diferentes superficies, generando corrosión de equipos, cascos de barcos, tuberías y de campos petroleros.
- **Concentración Mínima Inhibitoria**.- Es la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de un microorganismo patógeno
- **Fibrosis Quística**.- Es una enfermedad causada principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* que coloniza los pulmones y empieza la formación de sus biopelículas, es una enfermedad muy difícil de tratar con la farmacoterapia convencional.
- **Glutaraldehído**.- Es un líquido incoloro utilizado para esterilizar equipo médico y dental. Es un conservante químico y además es un intermedio para la producción de otros productos: pigmentos, resinas, productos electrónicos
- **Psicrófilos**.- Reciben este nombre las bacterias que para su crecimiento necesitan muy bajas temperaturas.
- **“Quórum sensing”**.- Se llama así a la señal que se produce entre las bacterias es decir una comunicación bacteriana a través de autoinductores que se generan por la influencia de factores internos o externos.
- **Ruta de Etner Doudoroff**.- Una de las rutas metabólicas que utilizan las bacterias para el catabolismo de los glúcidos.
- **Sésil**.- Forma de crecimiento de las bacterias en superficies profundas.
- **Sideróforos**.- Son compuestos que se producen en condiciones de hierro limitante que actúan como agentes quelantes específicos del ion férrico, y ayudan en el control biológico, de hongos y bacterias fitopatógenas.
- **Simbiosis**.- Relación interespecífica en las que ambos organismos obtienen un beneficio, este beneficio les es necesario para su supervivencia, por lo que la muerte de uno de los dos organismos provocará la muerte del otro.

IX.- ANEXOS

ANEXO 1

AGAR ROJO DE CONGO

Para la preparación de 100mL de Agar Rojo de Congo

Caldo de Tryptona	1.000 gr
Agar	1.500 gr
Extracto de levadura	0.500 gr
Congo Red	0.004 gr
Azul brillante de Coomasie	0.002 gr
Etanol	1.40 mL
Agua	c.s.p 100 mL

ANEXO Nº 2

PROCEDENCIA ESPECÍFICA DE LAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

CEPAS	SERVICIOS DEL H.N.E.R.M.	PROCEDENCIA DE LAS CEPAS
ATCC 9027	ATCC 9027	
CEPA 1	2 UCI	SEC. BRONQUIAL
CEPA 2	NEUROCIRUGIA	SEC. BRONQUIAL
CEPA 3	UCI	SEC. TRAQUEAL
CEPA 4	7 UCI	SEC. BRONQUIAL
CEPA 5	CIRUGIA	SEC. HERIDA
CEPA 6	UCI	LIQ.PLEURAL
CEPA 7	UCI	ORINA
CEPA 8	MEDICINA	ORINA
CEPA 9	TRAUMATOLOGIA	ORINA
CEPA 10	7 UCI	SEC. BRONQUIAL
CEPA 11	UCI	SEC. HERIDA
CEPA 12	NEUMOLOGIA	ASP.BRONQUIAL
CEPA 13	7 UCI	ASP. BRONQUIAL
CEPA 14	ENDOCRINOLOGIA	TEJIDO
CEPA 15	CIRUGIA GENERAL	CAT. VENOS. GEN.
CEPA 16	MEDICINA	ORINA
CEPA 17	MEDICINA	ORINA
CEPA 18	MEDICINA	ORINA
CEPA 19	UCI	ASP. BRONQUIAL
CEPA 20	EMERGENCIA	SEC. BRONQUIAL
CEPA 21	ENDOCRINOLOGIA	TEJIDO
CEPA 22	EMERGENCIA	ESPUTO
CEPA 23	MEDICINA INTERNA	TEJIDO
CEPA 24	CIRUGIA	SEC. PURULENTA
CEPA 25	CARDIOLOGIA	SEC. ABDOMINAL
CEPA 26	2 UCI	SEC. TRAQUEAL
CEPA 27	CIRUGIA GENERAL	CAT. VENOS. GEN.
CEPA 28	MEDICINA	ORINA
CEPA 29	7 UCI	SEC. HERIDA
CEPA 30	NEUMOLOGIA	ASP. BRONQUIAL
CEPA 31	CIRUGIA	SEC. ULCERA

PROCEDENCIA ESPECÍFICA DE LAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

CEPAS	SERVICIOS DEL H.N.E.R.M.	PROCEDENCIA DE LAS CEPAS
CEPA 32	NEUROCIRUGÍA	SEC. BRONQUIAL
CEPA 33	NEUMOLOGIA	ESPUTO
CEPA 34	DERMATOLOGIA	SEC. CUERO CABEL.
CEPA 35	ENDOCRINOLOGÍA	TEJIDO
CEPA 36	UCI	LIQU. PLEURAL
CEPA 37	NEFROLOGIA	LIQU. PERITONEAL
CEPA 38	MEDICINA INTERNA	ORINA
CEPA 39	REUMATOLOGIA	ORINA
CEPA 40	MEDICINA	UROCULTIVO
CEPA 41	INFECTOLOGÍA	SANGRE
CEPA 42	MEDICINA	SANGRE
CEPA 43	2 UCI	SEC. TRAQUEAL
CEPA 44	EMERGENCIA	SANGRE
CEPA 45	UCI	SANGRE
CEPA 46	MEDICINA	SANGRE
CEPA 47	2 UCI	CAT. VENOS. CEN.
CEPA 48	2 UCI	CAT. VENOS. CEN.
CEPA 49	7 UCI	CAT. VENOS. CEN.
CEPA 50	MEDICINA	ORINA
CEPA 51	MEDICINA INTERNA	ORINA
CEPA 52	HEMATOLOGIA	SANGRE
CEPA 53	HEMATOLOGIA	SANGRE
CEPA 54	CARDIOLOGÍA	SANGRE
CEPA 55	MEDICINA	SEC. HERIDA
CEPA 56	CIRUGIA	SEC. HERIDA
CEPA 57	CIRUGIA	SEC. HERIDA
CEPA 58	HEMATOLOGIA	SANGRE
CEPA 59	2 UCI	CAT. VENOS. CEN.
CEPA 60	MEDICINA	LIQ. ASCITICO
CEPA 61	MEDICINA	CATETER PUNTA
CEPA 62	MEDICINA	HISOPADO FARING.