



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

***Pseudomonas aeruginosa*: IMPORTANCIA CLÍNICA Y
COMPORTAMIENTO ACTUAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA:

CLAUDIA ALEJANDRA MARTÍNEZ LOZANO

ASESOR: M. EN C. ANA LAURA VAZQUEZ MARTÍNEZ

COASESOR: MD. HÉCTOR IVÁN SÁLDIVAR CÉRON

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Tesis y Examen Profesional**

Pseudomonas aeruginosa: importancia clínica y comportamiento actual.

Que presenta la pasante: **Claudia Alejandra Martínez Lozano**
Con número de cuenta: **408083070** para obtener el Título de la carrera: **Química Farmacéutico Biológica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Mayo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|-------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya | |
| VOCAL | Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil | |
| SECRETARIO | M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez | |
| 1er. SUPLENTE | Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres | |
| 2do. SUPLENTE | Dra. Raquel Gómez Pliego | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga*

Dedico este trabajo a mis padres y hermanos que siempre me motivaron y apoyaron para dar
lo mejor de mí.

A mi esposo e hijos que son mi razón para ser una mejor persona día con día.

A mis amigas Yesenia y Lupita que fueron pieza clave en mi desarrollo personal y profesional.

A mis asesores Ana e Iván que me apoyaron incondicionalmente en la realización de este
proyecto

ÍNDICE GENERAL

| | | |
|-----------|--|-----|
| 1. | RESUMEN | 1 |
| 2. | INTRODUCCIÓN | 2 |
| 3. | JUSTIFICACIÓN | 4 |
| 4. | OBJETIVOS | 5 |
| 5. | MARCO TEÓRICO | 6 |
| | 5.1 <i>Fisiología y estructura.</i> | 6 |
| | 5.2 <i>Patogenia e inmunidad</i> | 12 |
| | 5.3 <i>Epidemiología.</i> | 18 |
| | 5.4 <i>Enfermedades clínicas.</i> | 26 |
| | 5.5 <i>Diagnóstico de Laboratorio.</i> | 42 |
| | 5.6 <i>Estructura del genoma.</i> | 56 |
| | 5.7 <i>Plásmidos.</i> | 60 |
| | 5.8 <i>Bacteriófagos.</i> | 62 |
| | 5.9 <i>Resistencia a antibióticos y desinfectantes.</i> | 66 |
| | 5.10 <i>Sistema sensor del quorum.</i> | 86 |
| | 5.11 <i>Producción de alginato.</i> | 90 |
| | 5.12 <i>Biopelículas.</i> | 93 |
| | 5.13 <i>Motilidad.</i> | 98 |
| | 5.14 <i>Secreción de proteínas.</i> | 100 |
| | 5.15 <i>Producción de biosurfactantes</i> | 106 |
| | 5.16 <i>Ramnolípidos.</i> | 108 |
| | 5.17 <i>Producción de Polihidroxicanoatos.</i> | 114 |
| | 5.18 <i>Degradación de alcanos de cadena ramificada.</i> | 119 |
| 6 | CONCLUSIONES. | 123 |
| 7 | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. | 126 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Micrografía electrónica de barrido <i>P. aeruginosa</i> . | 7 |
| Figura 2. | Representación molecular de la envoltura de una bacteria Gram negativa. | 8 |
| Figura 3. | Colonias de <i>P. aeruginosa</i> en agar sangre. | 9 |
| Figura 4. | Pigmento producido por <i>P. aeruginosa</i> : piocianina. | 10 |
| Figura 5. | Modelo general de adherencia de <i>P. aeruginosa</i> . | 15 |
| Figura 6. | Papel del sistema tipo III de <i>P. aeruginosa</i> en la infección temprana por neumonía a células del epitelio pulmonar. | 16 |
| Figura 7. | Proporción de IAAS en 2014 cuyo agente etiologico fue <i>P. aeruginosa</i> . | 19 |
| Figura 8. | Técnica de electroforesis de campo pulsátil. | 22 |
| Figura 9. | Fundamento de la técnica de AP.PCR. | 23 |
| Figura 10. | Metodología de PCR-RFLP. | 24 |
| Figura 11. | Representación esquematizada de los pasos más importantes de diversas técnicas de tipificación. | 25 |
| Figura 12. | Ectima gangrenoso en paciente con bacteremia asociada a <i>P. aeruginosa</i> . | 27 |
| Figura 13. | Paciente con foliculitis pseudomónica- | 31 |
| Figura 14. | Progresión cutánea de las lesiones por <i>P. aeruginosa</i> . | 32 |
| Figura 15. | Caso de paroniquia, color característico debido a la presencia de piocianina. | 32 |
| Figura 16. | Úlcera corneal en paciente con queratitis por <i>P. aeruginosa</i> . | 36 |
| Figura 17. | Endoftalmitis pseudomónica con presencia de hipopión casi total en ambos ojos | 36 |
| Figura 18. | Paciente con otitis externa causada por <i>P. aeruginosa</i> . | 37 |
| Figura 19. | Otitis externa maligna con ectima gangrenoso. | 38 |
| Figura 20. | Paciente con mastoiditis. | 39 |
| Figura 21. | Colonias de <i>P. aeruginosa</i> color gris verdoso de 6 a 8 mm de diámetro en placa de agar sangre, se observa hemolisis β . | 45 |
| Figura 22. | Morfotipo mucoide de <i>P. aeruginosa</i> : Colonias secas de tono plateado. | 46 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 23. | Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> en agar Mueller-Hinton. | 46 |
| Figura 24. | Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> , En agar MacConkey (izquierda) se observan colonias de color rojo pardo, Lactosa (-). | 46 |
| Figura 25. | <i>P. aeruginosa</i> en agar Trypticase de soya muestra un color azul verdoso. | 47 |
| Figura 26. | Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> en agar cetrimida. | 47 |
| Figura 27. | Reacción oxidación fermentación en medio Hugh-Leifson | 47 |
| Figura 28. | Crecimiento de colonias de <i>P. aeruginosa</i> en agar chromID™ <i>P. aeruginosa</i> . | 48 |
| Figura 29. | Genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa PAO1. | 57 |
| Figura 30. | DNA del bacteriófago PM2 en su forma circular abierta | 63 |
| Figura 31. | Tratamiento de superficie con fago PA1Φ y su capacidad para remover biofilms formados por <i>P. aeruginosa</i> . | 64 |
| Figura 32. | Determinación del fagotipo de una cepa problema de <i>P. aeruginosa</i> en agar TSA: 73/352 /C188. | 65 |
| Figura 33. | Esquema del mecanismo de expulsión de antibióticos MexAB-OprM. | 67 |
| Figura 34. | Esquema porina OprD en la membrana externa de <i>P. aeruginosa</i> . | 70 |
| Figura 35. | Expresión de AmpC en estado basal. | 72 |
| Figura 36. | Inducción de AmpC por β-lactámicos en <i>P. aeruginosa</i> . | 73 |
| Figura 37. | Esquema de la síntesis de Homoserín-Lactona en bacterias Gram-negativas | 86 |
| Figura 38. | Integración de los sistemas sensing quorum Las y Rhl de <i>P. aeruginosa</i> con otros reguladores globales para la producción de múltiples factores de virulencia. | 88 |
| Figura 39. | Producción de alginato por <i>P. aeruginosa</i> colonias aisladas en agar Luria-Bertani. | 90 |
| Figura 40. | Modelo de la biosíntesis de alginato en <i>P. aeruginosa</i> . | 91 |
| Figura 41. | Formación de biofilms durante el proceso infeccioso por <i>P. aeruginosa</i> . | 92 |
| Figura 42. | Formación de biofilm de <i>P. aeruginosa</i> . | 94 |
| Figura 43. | Esquema de formación de biofilms. | 98 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura 44. | Estructura de flagelo en bacterias Gram negativas. | 99 |
| Figura 45. | Componentes de SSTI | 101 |
| Figura 46. | Modelo del mecanismo de translocación a través de la MI por el sistema Sec. | 102 |
| Figura 47. | Mecanismo de secreción tipo V. | 104 |
| Figura 48. | Sistemas de secreción en <i>P. aeruginosa</i> . | 105 |
| Figura 49. | Estructuras químicas generales de los glucolípidos microbianos | 106 |
| Figura 50. | Estructura química de diramnolípido producido por <i>P. aeruginosa</i> . | 109 |
| Figura 51. | Ruta metabólica de la biosíntesis de ramnolipidos y su relación con la biosíntesis de polihidroxicanoatos (PHA) y las moléculas del sistema sensing quorum. | 111 |
| Figura 52. | Reacciones involucradas en la biosíntesis de ramnolípidos. | 112 |
| Figura 53. | Regulación de la producción de ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i> . | 113 |
| Figura 54. | Electromicrografía de inclusiones de PHAs en <i>P. aeruginosa</i> 42A2. | 115 |
| Figura 55. | Estructura general de los polihidroxicanoatos. | 116 |
| Figura 56. | Representación esquemática del gen de PHA tipo II en <i>P. aeruginosa</i> . | 117 |
| Figura 57. | Biosíntesis de 3-polihidroxitartrato. | 118 |
| Figura 58. | Ruta metabólica de PHB y P(HB-HV) en <i>Alcaligenes eutrophus</i> . | 118 |
| Figura 59. | Ruta catabólica de Citronelol propuesta para <i>P. aeruginosa</i> PAO1. | 122 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabla 1. | Clasificación fenotípica de pseudomonadales (bacilos no fermentadores con flagelos polares). | 6 |
| Tabla 2. | Diferencias entre <i>Pseudomonas</i> y otros bacilos Gram negativos afines. | 9 |
| Tabla 3. | Desarrollo de <i>P. aeruginosa</i> en ambientes poco comunes. | 11 |
| Tabla 4. | Condiciones predisponentes a la infección por <i>P. aeruginosa</i> . | 12 |
| Tabla 5. | Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> . | 13 |
| Tabla 6. | Mecanismos de defensa del hospedador contra <i>P. aeruginosa</i> . | 17 |
| Tabla 7. | Perfil de resistencia en <i>P. aeruginosa</i> , México, 2014. | 19 |
| Tabla 8. | Epidemiología de infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i> . | 20 |
| Tabla 9. | Tipo de muestra y su procesamiento según la manifestación clínica en diagnostico microbiológico de <i>P. aeruginosa</i> . | 42 |
| Tabla 10. | Morfología colonial de <i>P. aeruginosa</i> en agares representativos. | 45 |
| Tabla 11. | Pruebas bioquímicas características de diversas especies de <i>Pseudomonas</i> . | 49 |
| Tabla 12. | Sistemas estandarizados para la identificación de <i>P. aeruginosa</i> mediante pruebas bioquímicas. | 52 |
| Tabla 13. | Tamaño de los genomas y número de genes de diversas bacterias. | 56 |
| Tabla 14. | Islas de patogenicidad del genoma de <i>P. aeruginosa</i> | 58 |
| Tabla 15. | Propiedades de los R-plásmidos de <i>Pseudomonas</i> que actúan inactivando la enzima específica para estos antibióticos | 60 |
| Tabla 16. | Plásmidos que confieren resistencia a iones metálicos en especies de <i>Pseudomonas</i> . | 61 |
| Tabla 17. | Características de algunos bacteriófagos típicos y sus genomas. | 62 |
| Tabla 18. | Mecanismos de resistencia a antibióticos. | 66 |
| Tabla 19. | Sistemas de flujo de <i>P. aeruginosa</i> . | 68 |
| Tabla 20. | Carbapenemasas aisladas en cepas de <i>P. aeruginosa</i> . | 74 |
| Tabla 21. | Enzimas modificadoras de aminoglucósidos presentes en <i>P. aeruginosa</i> | 77 |
| Tabla 22. | Mecanismos de acción de antisépticos y desinfectantes. | 79 |
| Tabla 23. | Antibioticos anti-pseudomónicos comunmente usados | 82 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabla 24. | Antibióticos utilizados en antibiograma para <i>P. aeruginosa</i> . | 84 |
| Tabla 25. | Clasificación y origen microbianop de biosurfactantes. | 107 |
| Tabla 26. | Microorganismos identificados en la degradación de compuestos derivados del petróleo | 128 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|--|
| ABC | ATP binding cassette. |
| ACP | Proteína transportadora de grupos acilo |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico. |
| AFLP | Amplification Fragm. Length Polymorphism. |
| APB | Acido fenil Borónico. |
| AP-PCR/ RAPD-PCR | Random Arbitrary Primed ADN-PCR. |
| ATP | Adenosin trifosfato. |
| BAS | Alquilbenceno de sulfonato de cadena ramificada. |
| B-DBS | Sulfonatos de dodecibenceno. |
| CAC | Compuestos cuaternarios de amonio. |
| CDC | Center For Disease Control And Prevention. |
| CFTR | Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. |
| CIM | Concentración Inhibitoria Mínima. |
| CMC | Concentración Micelar Critica. |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetraacético. |
| GEIs | Genomic island. |
| GES | Guiana Extended spectrum. |
| GIM | German Imipenemase. |
| GM 1 | Monosialoganglosido. |
| H ₂ S | Ácido sulfhídrico. |
| HPAs | Hidrocarburos policíclicos aromáticos. |
| IBC | <i>Integron Borne Cephalosporinase.</i> |
| IFN | Interferón. |
| IL | Interleucina. |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase. |
| LAS | Alquilbenceno de sulfonato de cadena lineal. |
| MATE | Multidrug and Toxic compound extrusión. |
| Mex | Multiple efflux. |

| | |
|----------|---|
| MFS | Major Facilitator Superfamily. |
| OPNG | <i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactioiranosido. |
| Opr | Porina. |
| PAGI | <i>P. aeruginosa</i> Genomic island. |
| PAPI | <i>P. aeruginosa</i> Pathogenicity Island. |
| PBPs | Proteínas de unión a penicilina. |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa. |
| PCR-RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism. |
| PF | Proteína de fusión. |
| PHMB | Mezcla heterodispersa de bioguanidas de polihexametileno. |
| PME | Proteína de membrana externa. |
| PQS | <i>Pseudomonas</i> quinolone signal. |
| Rep-PCR | Repetitive Extragenic Palindromic-PCR. |
| Rhl B | Ramnosiltransferasa 1. |
| RhIC | Ramnosiltransferasa 2. |
| RHOVE | Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica. |
| RND | Resistance Nodulation División. |
| rRNA | Ácido Ribonucleico ribosomal. |
| SIDA | Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida. |
| SMR | Small Multidrug Resistance. |
| SPE | Substancias poliméricas extracelulares. |
| Tat | Twit Arginine Translocation. |
| TLR | Toll Like Receptor. |
| TNF | Factor de Necrosis Tumoral. |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias. |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana. |

1. RESUMEN

Se presenta un análisis retrospectivo de *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria oportunista, extremadamente versátil, capaz de sobrevivir en ambientes inhóspitos y con requerimientos nutricionales mínimos. En el medio hospitalario se considera un grave problema de salud debido a la resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos, tal cualidad hace difícil el tratamiento de las infecciones pseudomónicas, aunado a eso la capacidad de comunicación y coordinación (Quorum sensing), formación de biofilms y la presencia de factores de virulencia, favorecen la existencia de cepas multirresistentes, para las cuales el tratamiento implica el uso de antibióticos que por su toxicidad estaban en desuso, aun con sus limitaciones se debe considerar como estrategia farmacológica, el empleo de la fagoterapia.

Sin embargo *P. aeruginosa* también es considerada una posible solución ambiental, al fenómeno de contaminación, ya que posee la capacidad de metabolizar una gran variedad de sustratos incluyendo n-alcanos, hexadecano y aceites. Los ramnolípidos promueven la interacción entre el sustrato hidrófobo y la célula, de tal forma que sea asimilado. Así mismo esta bacteria es capaz de producir polímeros biodegradables (Polihidroxicanoatos, PHAs) cuyo uso puede resolver el problema actual de la contaminación causada por el uso de polímeros sintéticos derivados del petróleo.

2. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo aerobio, móvil, de amplia distribución en la naturaleza (suelos, agua, plantas, animales, etc), sus requerimientos nutricionales son mínimos, puede tolerar un amplio intervalo de temperaturas (4 a 42 °C). Esta bacteria forma parte de la microflora normal intestinal y de la piel del ser humano, a pesar de esto, todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre, infecta a individuos con el sistema inmunocompromiso tales como: pacientes con Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida, cáncer o aquellos que se encuentra en terapia intensiva, representando un problema de salud en los centros hospitalarios. La virulencia que presenta *P. aeruginosa* es dada por sus componentes estructurales, toxinas y enzimas que produce, tiene la capacidad de instalarse en cualquier órgano o tejido y puede diseminarse por el torrente circulatorio produciendo septicemias de alta gravedad y mortalidad.

Debido a su alta resistencia (natural o adquirida) a antibióticos y desinfectantes, las infecciones producidas por este microorganismo son difíciles de tratar, esto se debe a las características de su membrana celular que tiene propiedades excepcionales de impermeabilidad y a la posesión de plásmidos que codifican la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos⁽¹⁻⁶⁾. Otra de sus características es su enorme capacidad de utilizar una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánico como fuentes de carbono y energía, así como de crecer en medios con bajas concentraciones de nutrientes (como el combustible de aviones, soluciones de clorhexidina y el jabón) esta capacidad le permite colonizar diversos nichos ecológicos^(2,3)

P. aeruginosa es una bacteria fascinante y temible, estudiada desde múltiples enfoques. En el sector salud por el tipo de patologías que produce y en el área biotecnológica por la producción de surfactantes, biopolímeros, en procesos de biorremediación de aguas, aire y suelos (por su capacidad de degradar alcanos y de utilizar el petróleo como fuente de carbono). El estudio de esta bacteria permitirá contestar el problema fundamental acerca de la manera en la que se adapta a múltiples ambientes así como abrir nuevas líneas de investigación⁽²⁾.

3. JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria versátil y de amplia distribución, debido a su incidencia como agente causal en infecciones hospitalarias, resulta trascendental conocer su importancia clínica, lo cual permitirá establecer las medidas de prevención y tratamiento adecuado. Así mismo la capacidad de sintetizar biopolímeros, ramnolipidos, polihidroxicanoatos y la degradación de derivados del petróleo, le confieren potenciales aplicaciones biotecnológicas.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Realizar una revisión bibliohemerográfica acerca de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mediante el análisis e interpretación de fuentes de información con la finalidad de establecer su importancia tanto clínica como biotecnológica y así poder inspirar nuevas líneas de investigación.

4.2. ESPECÍFICOS

4.2.1. Detallar la fisiología y estructura de *P. aeruginosa* con la finalidad de establecer los antecedentes necesarios.

4.2.2. Mencionar la patogenia y la respuesta inmunológica del hospedador a causa de la infección por dicho microorganismo.

4.2.3. Enumerar las enfermedades clínicas causadas por esta bacteria así como su respectiva epidemiología.

4.2.4. Describir los métodos de identificación de laboratorio y técnicas de tipificación molecular.

4.2.5. Detallar la estructura del genoma, así como los elementos extracromosómicos que la conforman.

4.1.6. Señalar los mecanismos que le confieren la resistencia natural a antibióticos y desinfectantes y su repercusión en el tratamiento de las infecciones causadas por esta.

4.2.7. Describir el sistema sensor del quorum para establecer su importancia sobre la patogénesis y persistencia de la infección.

4.2.8. Mencionar síntesis de ramnolípidos y polihidroxicanoatos así como sus potenciales aplicaciones.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Fisiología y estructura.

El género *Pseudomonas* grupo rRNA I (**Tabla 1**), pertenece a la familia Pseudomonadaceae, que se sitúa dentro del orden Pseudomonadales (bacilos no fermentadores con flagelos polares)⁽⁷⁾.

Tabla . Clasificación fenotípica de pseudomonadales (bacilos no fermentadores con flagelos polares)⁽⁷⁾.

| Grupo | Especies |
|---------------------------|---|
| rRNA I | Grupo Fluorescente <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> Grupo Stutzeri <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas mendocina</i> Grupo Vb-3 de los CDC Grupo Alcaligenes <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> Grupo 1 de especies de <i>Pseudomonas</i> |
| rRNA II | Grupo <i>Pseudomallei</i> (grupo resistente a colistina) <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> Complejo <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Burkholderia gladioli</i> Especies de <i>Pandoraea</i> Especies de <i>Ralstonia</i> Especies de <i>Cupriavidus</i> |
| rRNA III | Grupo oxidante débil <i>Comamonas acidovorans</i> <i>Comamonas terrigena</i> <i>Comamonas testosteroni</i> <i>Acidovorax delafieldii</i> <i>Acidovorax facilis</i> <i>Acidovorax temperans</i> <i>Lautropia mirabilis</i> WO-1 de los CDC |
| rRNA IV | Grupo Diminuta <i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i> |
| rRNA V | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
| Con pigmento amarillo | <i>Pseudomonas luteola</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> |
| H ₂ S positivo | <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Shewanella alage</i> |
| Halofílico | <i>Alishewanella fetalis</i> <i>Halomonas venusta</i> Grupo 1 de no fermentadores halofílico de los CDC |

Pseudomonas aeruginosa fue aislada por primera vez de muestras ambientales por Schroeter en 1872. La denominación de la especie deriva de la palabra aeruginosa (*aeruginous*) que significa “el color del cobre oxidado” reflejando el característico color azul-verdoso que presentan las colonias debido a la producción de pigmentos, tal capacidad ha clasificado a este microorganismo dentro de su género en el grupo fluorescente que se caracterizan por la producción de un pigmento pioverdina hidrosoluble que da fluorescencia blanca a verde azulada bajo luz ultravioleta de longitud de onda larga (400 nm)^(8,7).

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo que mide 0.6-1 μm por 2 μm y muestra una disposición en bacterias individuales, en pares y a veces en cadenas cortas (**Figura 1**). La mayor parte de las células poseen un solo flagelo polar, pero de forma ocasional algunos pueden tener dos o tres flagelos. La movilidad les permite responder a estímulos químicos (quimiotaxis), así como localizar sustratos en bajas concentraciones^(1,9).



Figura . Micrografía electrónica de barrido *P. aeruginosa* ⁽¹⁰⁾.

Los pilis presentes en la superficie bacteriana facilitan su adherencia a las células hospedadoras. Algunas cepas presentan glicocalix o sustancia mucoide, está compuesta por alginato, un polímero aniónico de ácido D-manurónico y ácido L-glucurónico^(1, 11).

La estructura y la composición de la pared celular de esta bacteria se asemejan a los de los microorganismos Gram negativos de la familia Enterobacteriaceae (**Figura 2**). El lipopolisacárido (LPS) de la pared celular está compuesto por polisacáridos centrales que son comunes a todas las cepas y polisacáridos de cadena lateral que son específicos de la cepa⁽¹²⁾.

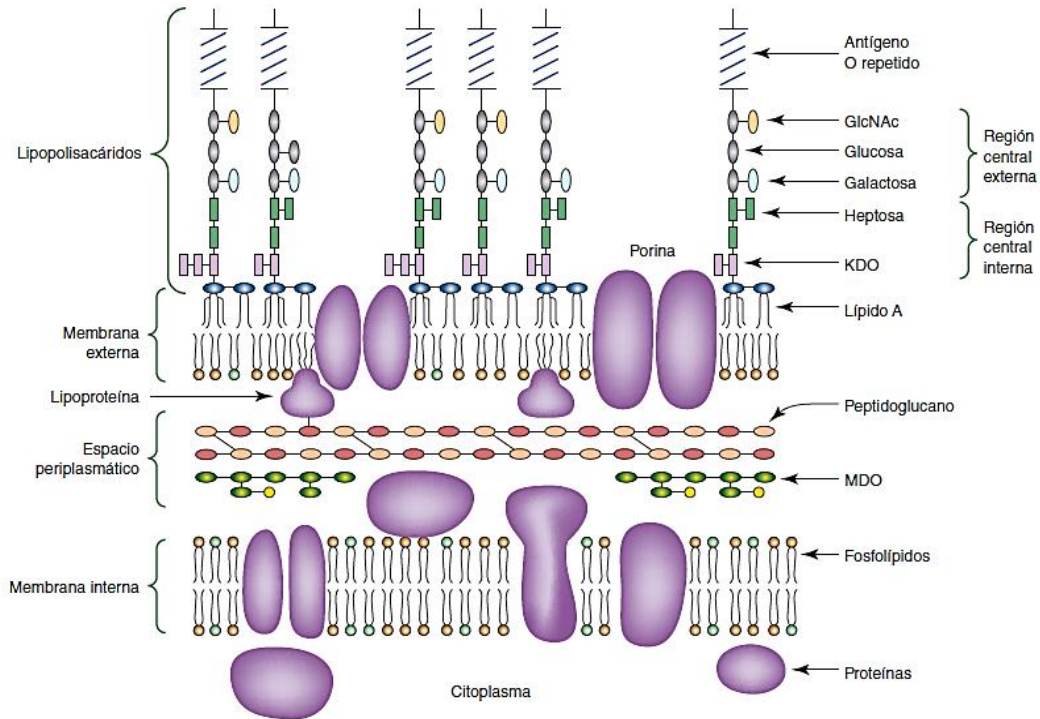


Figura . Representación molecular de la envoltura de una bacteria Gram negativa⁽¹⁾.

Como otras bacterias Gram negativas poseen una compleja membrana externa en la que se integra una porina principal (OprF) y muchas otras proteínas que, presumiblemente, también actúan como poro; de ellas la de mayor relevancia es OprD específica para los aminoácidos dibásicos y glutamato. Esta estructura limita enormemente el paso de nutrientes (y de otros compuestos, como antimicrobianos) al interior de los microorganismos. Estudios recientes indican que la permeabilidad esta también estrechamente regulada por varias bombas de expulsión activa, sometidas a complejos sistemas de regulación, gracias a los cuales los microorganismos pueden eliminar al exterior infinidad de compuestos tóxicos⁽¹³⁾.

Este microorganismo presenta metabolismo oxidativo de tipo respiratorio (**Tabla 2**), el desdoblamiento de la glucosa requiere su oxidación a gluconato en el periplasma entonces será traído al interior de la membrana interna por un sistema de asimilación dependiente de energía, una vez dentro es fosforilado a 6-P-Gluconato el cual entrara en el metabolismo central para producir energía para la célula. Posee oxidasa y catalasa, es un microorganismo sumamente adaptable que puede usar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Algunas especies pueden utilizar nitritos o arginina como último aceptor de electrones, lo que les permite crecer en condiciones anaerobias. Tiene una amplia distribución en la naturaleza y

suele estar presente en medios húmedos, en el laboratorio se multiplica fácilmente en muchos tipos de medios de cultivo, produciendo en ocasiones un olor dulce semejante a jugo de uva o a la tortilla de maíz, debido a la producción de 2-aminoacetofenona. Dado que la cantidad de ácido producida por las vías oxidativas es menos que la producida por fermentación deben emplearse medios especiales como el medio O-F de Hugh y Leifson; para las pruebas diagnósticas^(1, 4,6, 9, 13,14).

Tabla . Diferencias entre *Pseudomonas* y otros bacilos Gram negativos afines⁽⁶⁾.

| Género | Oxidasa | Hugh-Leifson | Flagelos |
|---------------------------|---------|------------------------------|----------------|
| <i>Pseudomonas</i> | + | Oxida/Indiferente/Alcaliniza | Polares |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | - | Fermenta | Peritricos; no |
| <i>Vibrio, Aeromonas</i> | + | Fermenta | Polar |
| <i>Acinetobacter</i> | - | Oxida/Indiferente | No |
| <i>Alcaligenes</i> | + | Alcaliniza | Peritricos |

A pesar de que su temperatura óptima de crecimiento es 35 C son capaces de crecer a 42 C. Cuando son cultivados en agar sangre desarrollan colonias rodeadas de un halo de β -hemólisis por la presencia de dos hemolisinas (**Figura 3**):

- Fosfolipasa termolábil (fosfolipasa C).
- Glicolípido termoestable que actúa como detergente desestabilizando membranas biológicas⁽¹⁵⁾.



Figura . Colonias de *P. aeruginosa* en agar sangre rodeadas por una zona de beta-hemólisis. Cultivo de 48 horas a 37 °C⁽¹⁶⁾.

Una propiedad distintiva de la *Pseudomonas* del grupo *fluorescens* es la producción de un pigmento amarillo verdoso, soluble en agua que difunde en el medio y da fluorescencia al iluminarlo con luz ultravioleta. Su síntesis está específicamente estimulada por la carencia de hierro lo que refleja su función como sideróforo o quelador de hierro, que solubiliza el hidróxido férrico proporcionando hierro soluble. *P. aeruginosa* tiene la capacidad de producir piocianina (1-hidroxi-5-N-metilfenazina) de color azul y el ácido fenazina-1-carboxílico de color amarillo a través de su metabolismo secundario. Esto ocurre cuando crecen aeróbicamente en medios pobres de fosfatos. El interés por estos compuestos deriva de sus propiedades antitumorales y antibióticas (Figura 4)⁽¹⁷⁾.

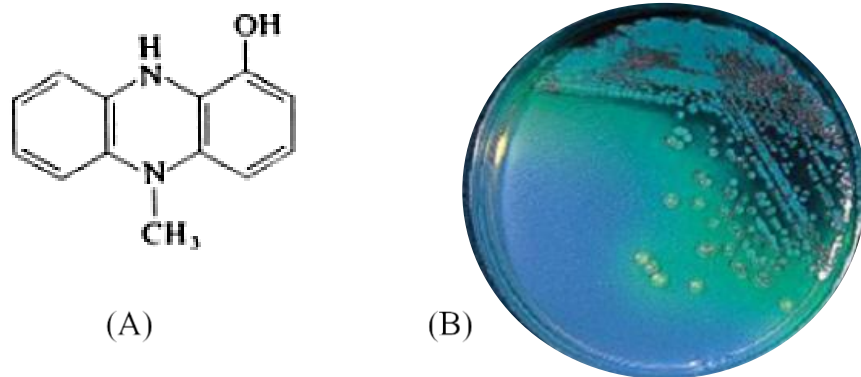


Figura . Pigmento producido por *P. aeruginosa*: piocianina. (A) Fórmula química⁽¹⁸⁾.
(B) Aislamiento en agar cetrimida⁽¹⁹⁾.

Es considerado como un microorganismo cosmopolita (Tabla 3), esta versatilidad se debe en gran medida por la gran cantidad de enzimas que posee, lo que le permiten usar una gran diversidad de sustancias como nutrientes⁽¹⁴⁾.

Tabla . Desarrollo de *P. aeruginosa* en ambientes poco comunes⁽²⁰⁾.

| Ambientes | Reservorio |
|---------------------------|--|
| Intrahospitalario | Ventilación mecánica Marcapasos Colchones hidrostáticos Vendas de yeso Tanques de Hubbard Broncofibroscopios Material de clampaje umbilical Soluciones de limpieza Aparatos de aspiración en quirófanos Material de suturación Material para medir el volumen de orina Medicamentos Desinfectantes Agua destilada |
| Extra hospitalario | Ambientes húmedos (Piscinas) Productos cosméticos Soluciones de lentes de contacto Combustibles Vegetales crudos Agua potable Leche no pasteurizada |

Se distinguen 3 tipos de antígenos en *P. aeruginosa*:

- Somático (O): El antígeno O, lipopolisacárido y termoestable, es responsable de la especificidad del grupo y está constituido por varios componentes antigénicos. Los serotipos se demuestran por reacciones de aglutinación, inmunofluorescencia y precipitación
- Flagelar(H): El antígeno H, termolábil, se considera que no solo está restringido al flagelo, y sería también un antígeno de superficie, el cual puede ser de dos tipos, que se subdividen en 8 determinantes principales.
- Mucoide (M). El antígeno M es responsable de la inaglutinabilidad de algunas cepas a los antígenos O y H⁽⁶⁾.

5.2. Patogenia e inmunidad.

Es una bacteria que no suele causar enfermedades en personas previamente sanas, los principales factores del hospedador relacionados con la infección por este patógeno incluyen:

- La pérdida de la barrera mucocutánea.
- Las alteraciones inmunológicas.
- Enfermedades de diversos orígenes (**Tabla 4**)⁽¹³⁾.

Tabla . Condiciones predisponentes a la infección por *P. aeruginosa*⁽²¹⁾.

| Condición | Tipo de infección |
|--|-------------------------------|
| Diabetes mellitus tipo 2 | Otitis externa maligna |
| Drogadicción | Endocarditis, osteomielitis |
| Leucemia | Sepsis |
| Neoplasias | Neumonía, sepsis |
| Quemados | Celulitis, sepsis |
| Fibrosis quística | Neumonía |
| Cirugía sobre el Sistema Nervioso Central | Meningitis |
| Traqueotomía | Neumonía |
| Período neonatal | Gastroenteritis |
| Úlcera corneal | Panofalmitis |
| Cateterización vascular | Tromboflebitis supurada |
| Cateterización urinaria | Infección del tracto urinario |

Para un patógeno oportunista como *P. aeruginosa*, la infección comienza luego de la alteración de los mecanismos normales del sistema inmune del hospedero. Posee múltiples factores de virulencia (**Tabla 5**) y su potencial patógeno deriva de la combinación de la expresión de varios de ellos: estudios recientes sugieren que la regulación de muchos de estos factores depende de un proceso de *quorum-sensing*. Las bacterias producen Acilhomoserin Lactona que puede difundir libremente a uno y otro lado de la membrana externa de la bacteria. De este modo, la concentración intracelular es reflejo de la extracelular, lo que permite al microorganismo «percibir» la existencia de otros individuos de la población en su proximidad. Cuando se ha alcanzado una masa crítica, los reguladores del sistema quorum-sensing inducen la expresión de diferentes genes de virulencia (elastasa, proteasa, sistema de secreción de proteínas, piocianina, lecitinasa, superóxido dismutasa, lactonas)^(13,22).

Tabla . Factores de virulencia de *P. aeruginosa*^(3,4,7,13,23).

| Factor de virulencia | Actividad biológica |
|---------------------------------|---|
| Alginato | Polisacárido capsular que permite a las bacterias infectantes adherirse a las superficies de las células epiteliales pulmonares y formar biopelículas que a su vez protegen a las bacterias de los antibióticos y el sistema inmune del cuerpo. |
| Pili | Apéndices de superficie que permiten la adherencia del microorganismo a los receptores del gangliósido GM-1 sobre las superficies de las células epiteliales del hospedador. |
| Neuraminidasa | Elimina los residuos de ácido siálico de los receptores de gangliósido GM-1, lo que facilita la unión del pili. |
| Flagelo | Le brinda motilidad al microorganismo y permite la unión a TLR2/TLR5. |
| Lipopolisacárido | Produce endotoxina, causa síndrome de sepsis; fiebre, shock, oliguria, leucopenia o leucocitosis, coagulación intravascular diseminada, anomalías metabólicas. |
| Exotoxina A | Destrucción tisular, inhibición del factor de elongación 2 interrumpe la actividad celular y la respuesta de los macrófagos. El principal órgano blanco de esta toxina es el hígado. |
| Exotoxina S | Inhibe la síntesis proteica e inmunosupresor. |
| Enterotoxina | Interrumpe la actividad gastrointestinal normal y provoca diarrea. |
| Exoenzima S | Ejerce acción citotóxica y actúa como adhesina para glucoesfingolípidos. |
| Fosfolipasa C | Hemolisina termolábil. Destruye la membrana citoplasmática; destruye la sustancia tensoactiva pulmonar; inactiva opsoninas. |
| Ramolípidos | Glucolípidos que contienen ramnosa termoestable actúan como hemolisinas termoestables, inhiben la actividad ciliar del pulmón. |
| Elastasa | Destrucción de los tejidos que contienen elastina, colágeno. Escinde las inmunoglobulinas y los componentes del complemento, interrumpe la actividad de los neutrófilos. |
| Proteasa alcalina | Destruye estructuras compuestas por fibrinas y elastina; se reporta que inactiva el interferón γ (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF). |
| Leucocidina o citotoxina | Proteína formadora de poros que afecta a la mayoría de células superiores. Inhibe la función de los neutrófilos y linfocitos. |
| Piocinanas | Suprime a otras bacterias e interrumpe la actividad de los cilios respiratorios; produce daño oxidativo de los tejidos con la producción de radicales de oxígeno tóxicos (peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales hidroxilo) sobre todo de los tejidos oxigenados como el pulmón. |

El proceso infeccioso se produce generalmente en tres etapas fundamentales: unión bacteriana (colonización), invasión local y enfermedad sistémica diseminada. Los factores de virulencia involucrados en el proceso son^(22, 23):

- Adhesión: fimbrias y alginato.
- Daño o invasión: acción directa de toxinas y exoenzimas, mediado por respuesta inflamatoria.
- Persistencia: Biofilms y adaptación al ambiente⁽²³⁾.

Puede adherirse tanto a células epiteliales como a superficies inertes. La adherencia celular esta mediada por fimbrias o pili o, en las cepas mucoides, por un exopolisacárido constituido por alginato, el cual es fundamental para la organización de biocapas bacterianas, donde el microorganismo queda protegido de la acción de polimorfonucleares, anticuerpos y antimicrobianos⁽¹³⁾.

El modelo de adherencia (**Figura 5**): implica los siguientes procesos:

- Un dominio localizado en la superficie del pili se une con un receptor específico en la superficie celular. Este dominio aparentemente está localizado en el disulfuro del carbono terminal que solo se expresa en la punta del pili. Los receptores son secuencias de carbohidratos de membrana glicoconjugadas o proteínas mucosas.
- El pili se retrae dibujando a la bacteria en la superficie celular, donde múltiples interacciones ocurrirán.
- Adhesinas localizadas en la superficie celular, tales como exoenzima S, reaccionan con los receptores de membrana proporcionando múltiples enlaces y la creando uno esencialmente irreversible con la bacteria.
- Durante las infecciones crónicas los organismos producen un exopolisacárido mucoide (MEP o alginato) que interactúa con el glicocáliz de la membrana celular y forma una matriz protectora alrededor de los organismos. La multiplicación de las bacterias dentro de la matriz da como resultados microcolonias de organismos⁽²⁴⁾.

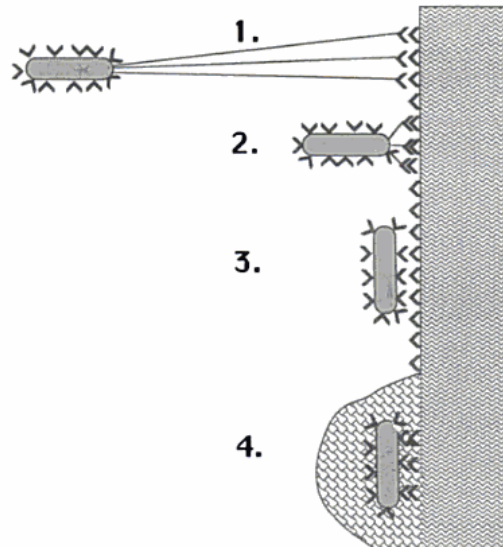


Figura 5. Modelo general de adherencia de *P. aeruginosa*⁽²⁴⁾.

En la etapa de invasión a los tejidos produce y excreta toxinas que le permiten implantarse, entre ellas las más estudiadas son:

- Elastasa.
- Fosfatasa alcalina.
- Exotoxina A.

Las cuales pueden causar shock, inducir la muerte de células, e incluso hidrolizar proteínas estructurales de los tejidos. El análisis de la elastasa, la fosfatasa alcalina y la exotoxina A, como marcadores de la infección, sin embargo la respuesta inmune humoral que se dirige hacia la exotoxina A es variable. Esta toxina inhibe la síntesis proteica en las células eucariotas, una vez se ha unido al receptor presente en ellas; su expresión está inducida por las condiciones limitantes de oxígeno que se encuentran en el hospedador y está posiblemente implicada en la dermatonecrosis que tiene lugar en las quemaduras o en el daño tisular en las infecciones pulmonares crónicas. Además posee actividad inmunodepresora⁽²⁵⁾.

Aunque la patogénesis es multifactorial, el sistema de secreción tipo III es el mayor determinante de virulencia: este sistema de secreción es común en muchos patógenos Gram negativos y funciona transportando toxinas directamente desde la bacteria adherida a la célula eucariota. Este sistema de secreción transporta cuatro toxinas (exoS, exoT, Exo U y Exo Y)

implicadas en la inhibición de la fagocitosis, promoción de destrucción tisular y el retardo de la curación de heridas (**Figura 6**).

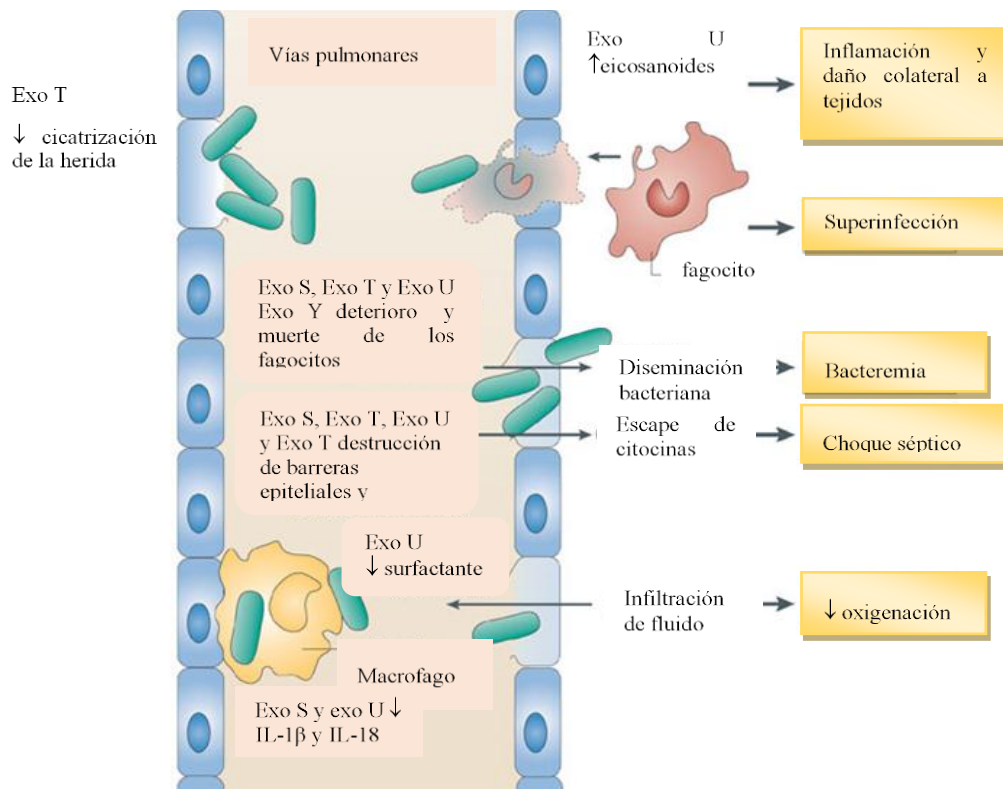


Figura 6. Papel del sistema tipo III de *P. aeruginosa* en la infección temprana por neumonía a células del epitelio pulmonar⁽²⁷⁾.

La formación de biofilms también juega un papel muy importante en la patogénesis, ya que permite a este microorganismo colonizar superficies como instrumentos médicos, lentes de contacto. Comparados con otras formas planctónicas, los microorganismos que crecen formando parte de biofilms presentan elevada resistencia a los antibióticos, a los mecanismos de eliminación mediado por el complemento a la fagocitosis y a los biocidas. Esto hace que las infecciones sean difíciles de tratar⁽²⁶⁾.

Los factores de virulencia actúan de forma coordinada sobre el hospedador, el cual despliega un sistema defensivo contra la infección:

- Barrera de células epiteliales.
- Anticuerpos.
- Sistema del complemento.

- Células fagocíticas.
- Linfocitos⁽²¹⁾.

Sin embargo, pacientes con el sistema inmune comprometido tienen predisposición a infecciones causadas por *P. aeruginosa* (**Tabla 6**):

Tabla 6. Mecanismos de defensa del hospedador contra *P. aeruginosa*⁽²¹⁾.

| Sistema de defensa del Hospedador | Mecanismo de acción | Predisposición a infección |
|--|---|---|
| Barrera epitelial | Primera línea de defensa contra Pseudomonas, actúa como barrera mecánica. | Quemaduras Traumatismos |
| Inmunidad humoral | Anticuerpos contra exotoxina Anticuerpos fagocíticos | Leucopenia Terapia con corticosteroides Inmunosupresión |
| Complemento | Sistema de proteínas séricas | Bajos niveles de properdina (Pacientes quemados o con neoplasias) |
| Inmunidad Celular | Linfocitos T | Fibrosis quística |
| Células fagocíticas | Granulocitos | Granulocitopenia |
| Sistema fagocítico mononuclear | Neutrófilos Monocitos Macrófagos | Fibrosis quística |

5.3. Epidemiología.

Es uno de los patógenos oportunistas de mayor relevancia médica. Esta bacteria posee un metabolismo extraordinariamente versátil que le permite vivir en hábitats tan diversos como el suelo, aguas, plantas, alimentos y ambientes hospitalarios, en particular en ambientes húmedos. Su aislamiento en muestras clínicas puede representar tanto colonización como infección^(13, 26).

En el género de *Pseudomonas*, la mayoría de las infecciones humanas son causadas por *P. aeruginosa*, normalmente en individuos con el sistema inmune comprometido:

- Pacientes con VIH.
- Receptores de trasplantes de órganos.
- Pacientes con quemaduras.

Están particularmente predispuestos a las infecciones por pseudomonadales y la mortalidad puede ser alta (ej. tan alta como del 90% en infecciones cardíacas). En quemaduras y heridas hay destrucción de vasos sanguíneos, lo cual limita el acceso de los fagocitos que normalmente podrían liberar del patógeno a la región. Los pacientes con fibrosis quística también están bajo un alto riesgo de infección ya que la alteración que presentan, frecuentemente permite la colonización del epitelio del tracto respiratorio y el desarrollo de neumonía. Esto se observa con frecuencia en niños, los cuales pueden sufrir crisis recurrentes que cursan con fiebre, tos sibilante y productiva, abdomen distendido, dificultades para respirar y cianosis. Lo anterior frecuentemente acompañado de pérdida de peso⁽²⁸⁾.

En Estados Unidos para el 2013 el CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) reportó que aproximadamente el 8% de las infecciones son causadas por *P. aeruginosa*, un estimado de 51,000 infecciones asociadas a esta bacteria, entre las cuales se encuentran:

- Bacteremias, incluye bacteremia primaria, relacionada a catéter, no demostrada y sepsis.
- Neumonías.
- Infección de las Vías Urinarias.
- Infección de Herida Quirúrgica, incluye superficial, profunda, de órganos y espacios.
- Otras: Infección de sitios de catéter, infecciones de piel y tejidos blandos, conjuntivitis, gastroenteritis, infección de úlceras, endometritis, etc.

De las cuales más de 6,000 (13%) resultaron cepas multirresistentes, es decir presentaron resistencia a 3 o más familias de antibióticos incluidos aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y carbapenémicos, 440 de estas infecciones resultaron con desenlace fatal⁽²⁹⁾.

En México, según la RHOVE (Red Hospitalaria de vigilancia Epidemiológica) en el 2014 *P. aeruginosa* fue responsable del 12.8% de las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) de un total de 32,975(**Figura 7**)^(30,144).

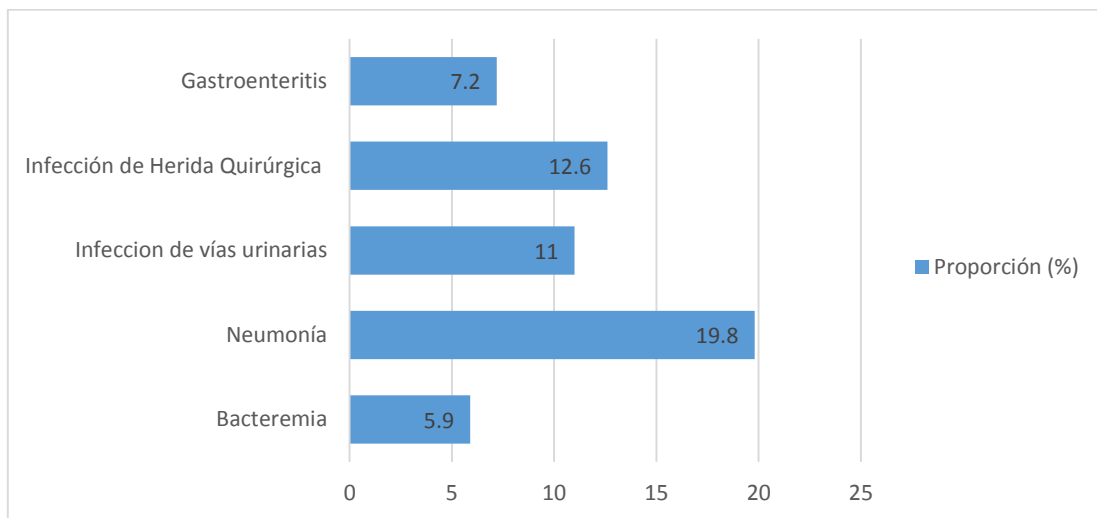


Figura 7. Proporción de IAAS en 2014 cuyo agente etiológico fue *P. aeruginosa*.⁽¹⁴⁴⁾.

La vigilancia epidemiológica de las IAAS en el 2014 ha permitido identificar un perfil de resistencia de *P. aeruginosa* (**Tabla 7**)⁽¹⁴⁴⁾.

Tabla . Perfil de resistencia en *P. aeruginosa*, México, 2014⁽¹⁴⁴⁾.

| Antimicrobiano | % Resistencia |
|-------------------------|----------------------|
| Ampicilina | 19.5 |
| Amikacina | 25.1 |
| Ampicilina-sulbactam | 14.6 |
| Piperacilina-tazobactam | 6.5 |
| Cefuroxima | 1.5 |
| Cefepime | 19.5 |
| Ceftazidima | 14.6 |
| Ceftriaxona | 38.4 |
| Cefotaxima | 12.1 |
| Imipenem | 5.9 |
| Meropenem | 16.3 |
| Ciprofloxacino | 22.4 |

Las infecciones involucran endoscopios contaminados, debido al inadecuado procesamiento de los mismos en el lavado automático o manual, secado e inmersión en desinfectantes sin tener en cuenta los canales y sus accesorios. Además el secado incompleto y el almacenamiento húmedo. Otros equipos como nebulizadores, analizadores de oxígeno, monitoreo urodinámico, máquinas de diálisis, también han sido reportados como fuentes de contaminación.

El agua es considerada como un foco en epidemias hospitalarias (**Tabla 8**), debido a la contaminación de piletas, palanganas, tanques de hidroterapia, máquinas de hielo y otros. Por ejemplo se encontró que el agua caliente de baño de soluciones de plasma y albúmina para transfusiones en neonatología se había contaminado con este microorganismo.

Tabla . Epidemiología de infecciones causadas por *P. aeruginosa*⁽³²⁾.

| Órgano | Infección | Agudo/crónico | Origen | Prevención |
|--------------------------------|--|----------------------|--|--|
| Ojo | Lentes de contacto Queratitis | Agudo | Agua | Higiene |
| Piel | Foliculitis /ulcera Infecciones Infección de quemaduras | Agudo | Agua | Higiene |
| Oído | Otitis externa | Agudo/crónico | ¿Agua? | Higiene |
| Senos nasales | Sinusitis | Crónico | ¿Agua? | ¿? |
| Vías urinarias | Infección en tracto urinario | Agudo/crónico | ¿? | ¿? |
| Huesos | Osteomielitis en pie diabético | Crónico | ¿Agua? | Higiene |
| Pulmones/ bronquios | Neumonía asociada a ventilación Endobronquiolitis Fibrosis quística Bronquioectasias | Agudo Crónico | Nosocomial Humificadore s Nosocomial ambiental | Higiene, Higiene Terapia agresiva de erradicación con antibióticos |
| Sangre | Sepsis, pacientes neutropénicos | Agudo | ¿? | Profilaxis con antibióticos |

La contaminación con *P. aeruginosa* de las manos de los trabajadores de la salud, puede contribuir a la infección cruzada entre pacientes. En una epidemia la contaminación de crema para manos fue responsable de la misma, de allí la importancia de que las cremas para manos de los trabajadores de la salud, sean de uso y diseño hospitalario. Otra reciente epidemia sugirió que las uñas postizas de una enfermera colonizada dispersó a la bacteria en una unidad de neonatología. Otra epidemia de ventriculitis en pacientes con catéter de derivación externa, relacionó las manos colonizadas del personal con la diseminación del microorganismo.

Pseudomonas es un organismo ubicuo que puede contaminar verduras frescas, se halló que el 19% de los vegetales servidos a los pacientes en una unidad de oncología habían cultivado *P. aeruginosa*. Por tal motivo se recomienda fuertemente no servir verduras crudas a los pacientes inmunocomprometidos⁽³¹⁾.

Para la determinación de la relación epidemiológica de aislamientos de esta bacteria particularmente en el entorno nosocomial, se emplean en la actualidad diversas técnicas de epidemiología molecular, que han sustituido los sistemas previos basados en la biotipia y fagotipia. Entre estos sistemas encontramos a técnicas como la electroforesis en gel de campo pulsante (considerado en método de referencia), la riobiotipia, o las técnicas basadas en la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) están ofreciendo excelentes resultados. La resistencia a antibióticos de las especies aisladas se determina utilizando pruebas de susceptibilidad tales como la difusión en disco y el de la concentración inhibitoria mínima (CIM). A si mismo se realiza el análisis de la huella genómica por electroforesis y el análisis molecular por PCR^(13,33).

La electroforesis de campo pulsátil (ECP) es una técnica ha mostrado ser altamente reproducible y con un poder de discriminación elevado, por lo que se ha convertido en el método de referencia de tipificación para la mayoría de las bacterias con interés epidemiológico. La ECP se basa en la separación electroforética en campo pulsado del ADN cromosómico digerido con una enzima de restricción con baja frecuencia de corte (**Figura 8**). Los perfiles de ADN (pulsotipos) presentan entre 10 y 30 fragmentos de ADN con un tamaño variable, que oscila entre 10 y 800 kb. La interpretación de estos se realiza aplicando los criterios de Tenover et al, y suele ser relativamente fácil cuando se trabaja con unas pocas cepas. Cuando el número de cepas es elevado o los perfiles de bandas son complejos es conveniente recurrir a la utilización de un software específico, como por ejemplo BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) o GelCompar (Applied Maths). Estos programas permiten normalizar las condiciones de migración de los perfiles electroforéticos entre experimentos almacenándolos en bases de datos. Disponer de un histórico de aislados del centro es lo que permite establecer conexiones que estaban “ocultas” si no conducían a un aumento inmediato del número de casos. Además, contienen un algoritmo para realizar estudios de filogenia que permiten establecer relaciones evolutivas o de parentesco entre los aislados, mediante la utilización de dendogramas^(34,35).

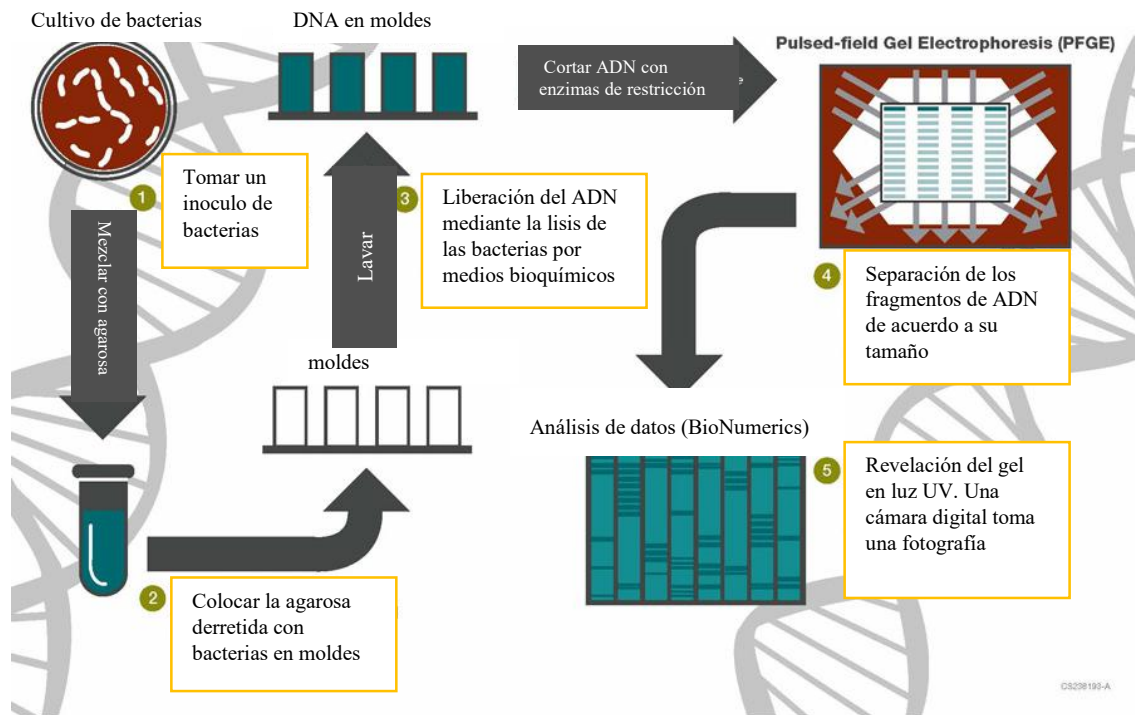


Figura 8. Técnica de electroforesis de campo pulsátil⁽³⁶⁾.

Existe una serie de parámetros básicos de la ECP que deben definirse o determinarse en el laboratorio para asegurar una buena reproducibilidad. Los más importantes son la normalización del gel, el porcentaje de tolerancia en la posición de las bandas y punto de corte de similitud para definir los “clusters”. Los inconvenientes más destacados de la ECP son su relativo elevado costo económico inicial, excesiva laboriosidad (proceso no automatizado) y el tiempo necesario para obtener y analizar los resultados (una semana como mínimo), por lo que resulta una metodología poco práctica para introducirla en la rutina de un laboratorio convencional de microbiología clínica. Las ventajas consisten en que se pueden aplicar a un gran número de especies bacterianas, se puede almacenar los perfiles, al menos de forma local y, sobre todo, su alto nivel de discriminación, ya que analizan una gran parte del cromosoma bacteriano. Esta capacidad de detectar pequeñas variaciones entre los aislados le confiere características idóneas para el estudio de brotes a nivel local.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han supuesto un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas. La PCR que utiliza cebadores arbitrarios (AP-PCR) (**Figura 9**) y la PCR que utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (rep-PCR) son las técnicas de PCR más utilizadas para tipificar bacterias y hongos.

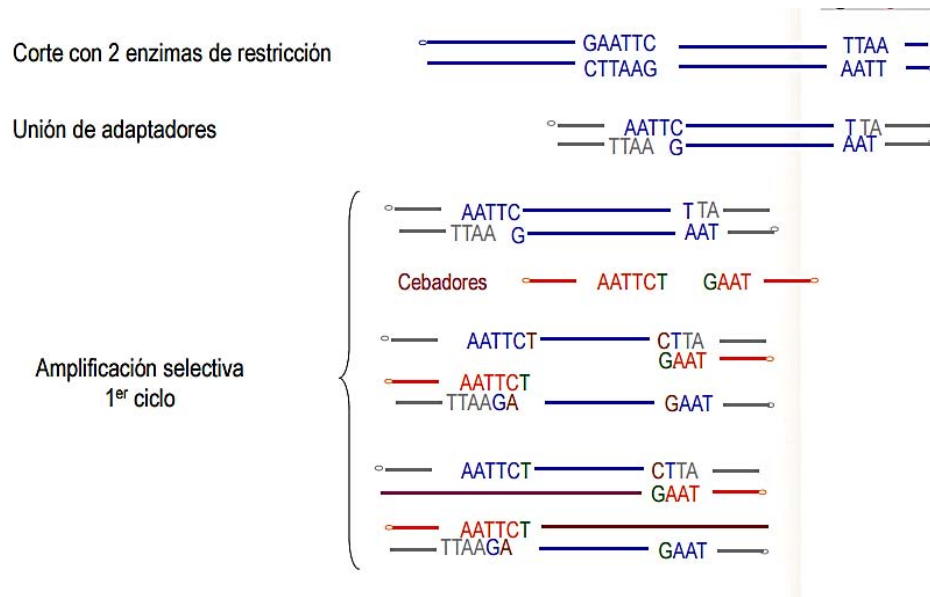


Figura 9. Fundamento de la técnica de AP.PCR⁽³⁷⁾.

Estas técnicas son sencillas de realizar, rápidas y poseen un elevado poder de discriminación. La AP-PCR es relativamente poco reproducible, por lo que tiene que ser validada o estandarizada en cada laboratorio. La digestión con enzimas de restricción de genes amplificados mediante PCR constituye la base de la PCR-RFLP (**Figura 10**).

Corte mediante enzimas de restricción

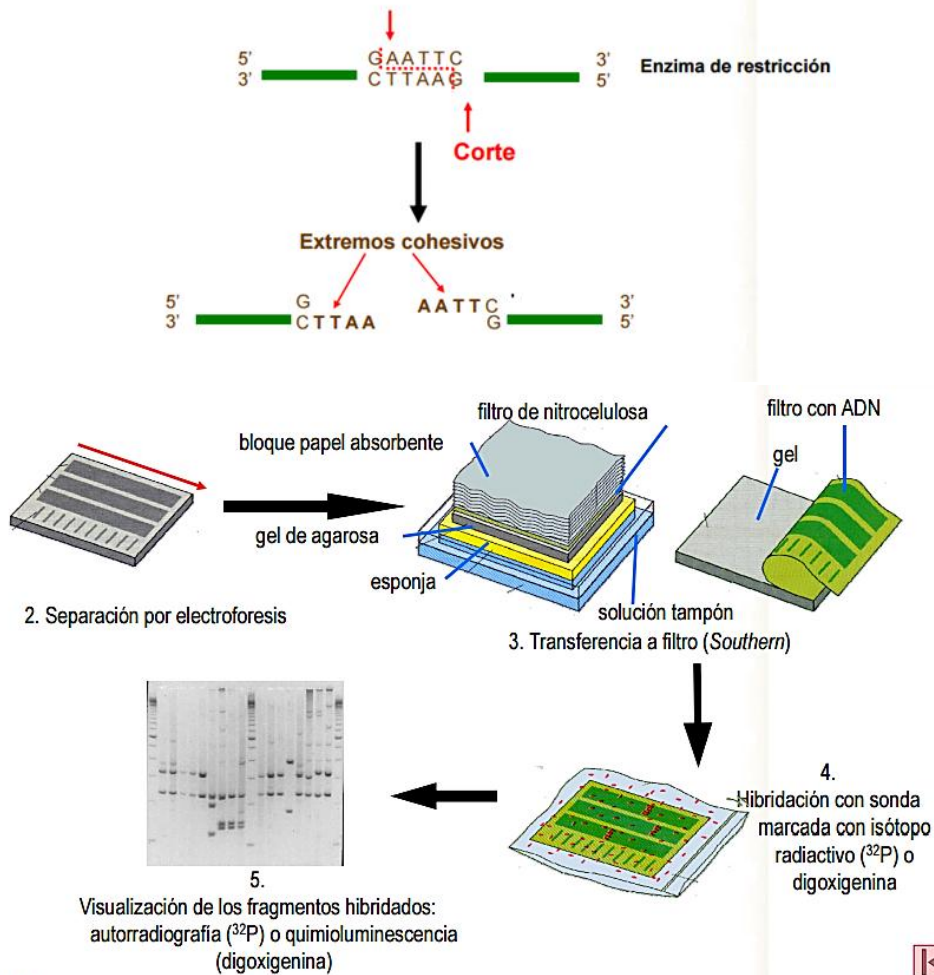


Figura 10. Metodología de PCR-RFLP⁽³⁷⁾.

Esta técnica es sencilla y muy reproducible, pero suele ser menos discriminativa que la AP-PCR o la rep-PCR. El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se basa en la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN obtenidos por restricción enzimática del ADN cromosómico. La mayoría de las técnicas de tipificación basadas en la PCR son menos laboriosas, más rápidas y más fáciles de realizar e interpretar que la electroforesis en campo pulsante (PFGE; técnica de referencia para la mayoría de bacterias y hongos), pero suelen ser, por lo general, menos reproducibles y discriminativas que esta última, dependiendo de la especie estudiada y de la técnica de PCR empleada (**Figura 11**)^(34,35).

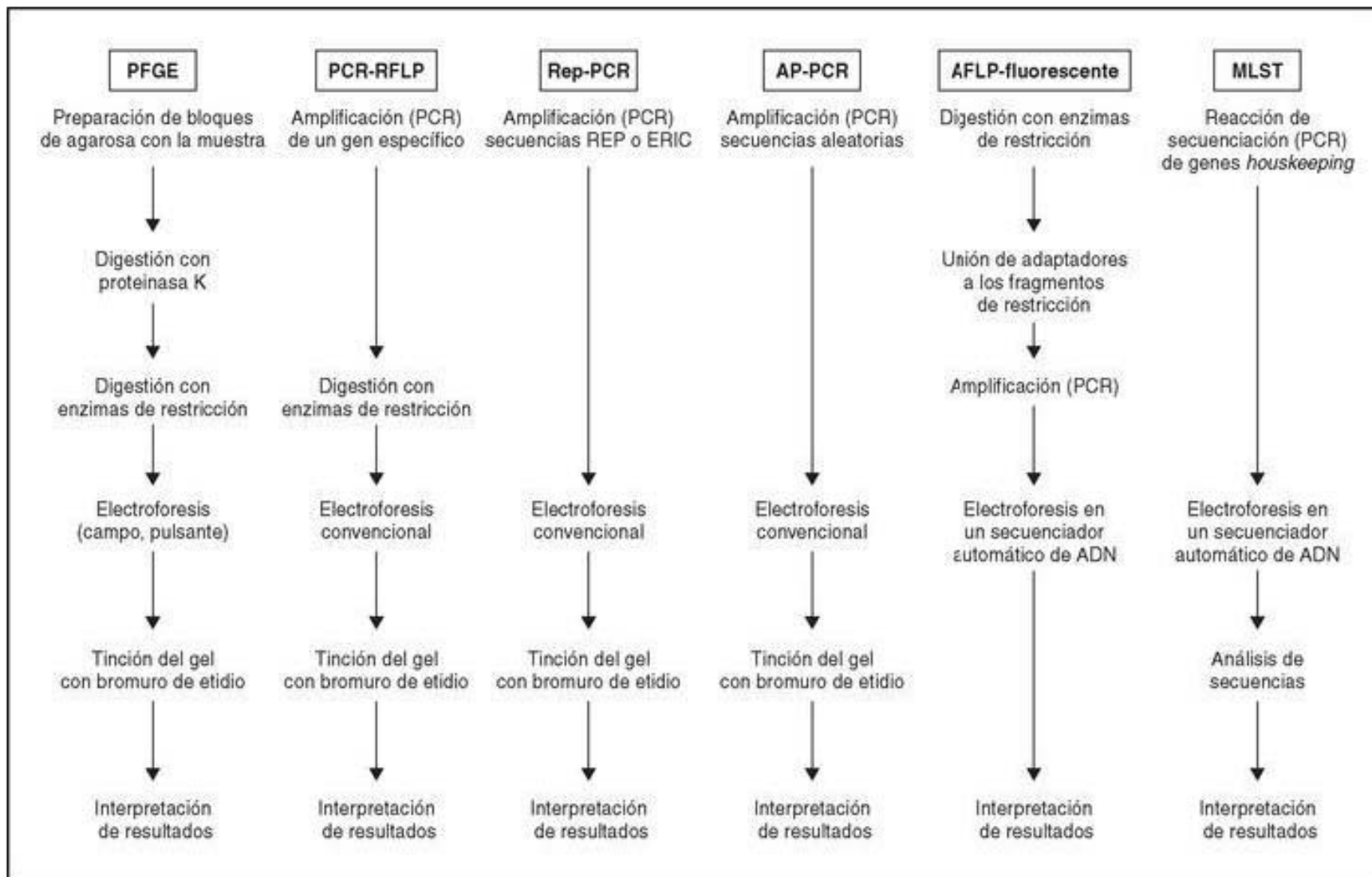


Figura 11. Representación esquematizada de los pasos más importantes de diversas técnicas de tipificación.⁽³⁴⁾

5.4. *Enfermedades clínicas.*

5.4.1. *Infecciones relacionadas con Líneas Vasculares.*

Cualquier infección que se genere de la instalación y permanencia de una línea vascular, ya sea corta, larga, permanente o transitoria y que puede manifestarse desde una infección localizada a nivel del punto de inserción, hasta una sepsis, tales como: bacteremia y endocarditis⁽³⁸⁾.

Bacteremia. La mayoría de las bacteremias por *P. aeruginosa* tienen un origen nosocomial (aproximadamente 80%) desencadenadas por manipulaciones a las que están sometidos los pacientes ingresados, como la presencia de catéteres intravenosos, sondas urinarias, intubación orotraqueal y heridas quirúrgicas. Los pacientes más vulnerables son los que presentan factores predisponentes como la inmunodepresión, neutropenia, mucositis secundaria a la quimioterapia, uso previo de glucocorticoides, diabetes mellitus tipo 2, insuficiencia renal, déficit de inmunoglobulinas, SIDA, los pacientes quemados, los recién nacidos y los trasplantados. En raras ocasiones pacientes sanos presentan bacteremia de origen comunitario⁽¹³⁾.

Clínicamente, la sepsis causada por este microorganismo no se distingue de las causadas por otros bacilos Gram negativos, por lo general los pacientes tienen fiebre, pero aquellos con enfermedad grave pueden encontrarse en estado de choque o incluso hipotermia. El único punto de diferenciación es la presencia de lesiones violáceas hemorrágicas en la piel (ectima gangrenoso), las cuales son sugestivas de infección por *P. aeruginosa* debido a la invasión secundaria de pequeñas arterias y venas. Son lesiones pequeñas o grandes, dolorosas, eritematosas y macopapulares tienen bordes irregulares, al inicio son rosadas y más tarde se oscurecen hasta adquirir un color purpúrico y por último se tornan negruzcas y necróticas (**Figura 12**)^(13,39).



Figura 12. Ectima gangrenoso en paciente con bacteremia asociada a *P. aeruginosa*⁽⁴⁰⁾.

Se han notificado tasas de mortalidad que exceden el 50% en pacientes con bacteremia por *P. aeruginosa*. Los factores pronósticos negativos son:

- La persistencia de neutropenia grave.
- Shock séptico.
- Neumonía.
- Insuficiencia renal.
- Metástasis.
- Tratamiento antibiótico inapropiado^(13,39).

En pacientes con bacteremia el tratamiento depende de:

- Hospedador sin neutropenia: Ceftazidima, cefepime, Piperacilina/tazobactam, imipenem, meropenem o doripenem. Para pacientes en estado de choque se añade un aminoglucósido (tobramicina o amikacina).
- Hospedador con neutropenia: Cefepime o todos los demás con excepción de doripenem⁽³⁹⁾.

Endocarditis. *P. aeruginosa* produce endocarditis en dos situaciones bien definidas: pacientes usuarios de drogas ilícitas vía parenteral y pacientes portadores de válvula protésica. Las endocarditis en drogadictos, se debe a la presencia del microorganismo en el vehículo utilizado para preparar la droga, la inyección del material extraño mezclado con la heroína puede producir alteración del endocardio o los velos valvulares generándose fibrosis y así

favorecer la invasión del tejido valvular, generalmente se produce una afectación de la válvula tricuspídea, pero es frecuente que se afecten varias válvulas⁽¹³⁾.

Las manifestaciones de endocarditis por *P. aeruginosa* son similares a las de endocarditis aguda en usuarios de fármacos intravenosos, excepto que la enfermedad tiene evolución más lenta que la endocarditis por *Staphylococcus aureus*. En la mayor parte de los casos, el padecimiento afecta las cavidades derechas del corazón, pero no es rara la afección de las cavidades izquierdas y la enfermedad de múltiples válvulas. La fiebre es una manifestación común, al igual que la afectación pulmonar (por la producción de émbolos sépticos a los pulmones). Por tanto, los pacientes también pueden experimentar dolor torácico y hemoptisis. La afección de las cavidades izquierdas del corazón puede conducir a manifestaciones clínicas de insuficiencia cardiaca, embolia generalizada y cardiopatía local con abscesos en el seno de Valsalva y trastornos de la conducción. Las manifestaciones cutáneas son poco habituales en esta enfermedad y no se observa ectima gangrenoso⁽³⁹⁾.

La terapia antibiótica más utilizada ha sido la combinación de un β -lactámico con un aminoglucósido. Otros antibióticos de interés para esta indicación son los carbapenémicos (meropenem), ciprofloxacino y aztreonam. En la endocarditis tricúspide, el tratamiento antibiótico con un B-lactámico/cefalosporina antipseudomónica asociado a un aminoglucósido durante 4-6 semanas⁽¹³⁾.

5.4.2. Infecciones de Vías Urinarias.

P. aeruginosa suele producir infecciones urinarias nosocomiales casi siempre como complicación de un cuerpo extraño en dichas vías, obstrucción del aparato genitourinario o por instrumentación o intervención quirúrgica de las vías urinarias. La presencia de sonda vesical tiene un papel importante en su patogenia, debido a la tendencia de esta bacteria a producir biofilms y protegerse así del efecto antibiótico, puede asegurar su crecimiento metabolizando los componentes de la sonda urinaria; además el zinc de algunas de estas sondas produce una disminución de la producción de OprD, lo que causa resistencia a los carbapenémicos^(13,39).

La infección urinaria es una causa frecuente de bacteremia, ya que en esta se constata un foco urinario hasta el 40% de los casos.

La clínica de la infección urinaria es indistinguible de la producida por otros microorganismos. En el caso del paciente con sonda, si ésta no puede retirarse, se recomienda tratar sólo las infecciones que cursen con clínica: El tratamiento es con un aminoglucósido o β -lactámico antiseudomónico, a no ser que curse con bacteremia o abscesos renales o se trate de pacientes con neutropenia. El tratamiento con ciprofloxacino parece razonable⁽¹³⁾.

5.4.3. Infecciones Óseas y Articulares.

Puede afectar estructuras osteoarticulares, bien por siembra hematógena o por contigüidad; tiene la predilección por estructuras cartilaginosas y afecta articulaciones y hueso adyacente, tales como: Espondilitis, Artritis Esternocostoclavicular, Osteoartritis de la sínfisis púbica, Osteítis del pie y Osteomielitis por contigüidad.

Espondilitis. La espondilitis aguda se observa con frecuencia en pacientes usuarios de drogas ilícitas por vía parenteral en los que se ha producido previamente bacteremia por *P. aeruginosa*, no necesariamente documentada; puede afectar las vértebras cervicales. Otros factores predisponentes son las infecciones urinarias pélvicas, que pueden alcanzar vertebras lumbosacras a través del retorno venoso (plexo Batson). En ocasiones se produce en el curso de una sepsis nosocomial (catéter venoso), por siembra hematógena vertebral: clínicamente aparece dolor sordo local, con disminución de la motilidad y fiebre: el tratamiento es la combinación de un β -lactámico antiseudomónico durante 6 semanas, se puede utilizar también ceftazidima, imipenem o ciprofloxacino⁽¹³⁾.

Artritis esternocostoclavicular. Es característica, aunque no exclusiva del adicto a drogas por vía parenteral y suele presentarse como monoartritis. Aparece dolor en la articulación, en ocasiones de larga evolución, con signos inflamatorios locales, fiebre y limitación de la movilidad del hombro, con o sin endocarditis, suele haber afectación del hueso adyacente, y la limpieza quirúrgica es necesaria. El tratamiento antibiótico con un aminoglucósido más un β -lactámico antiseudomónico debe prolongarse durante 6 semanas. La recuperación funcional es buena^(13,39).

Osteoartritis de la sínfisis púbica. Se observa como complicación tras la cirugía pélvica o en el adicto: los síntomas son dolor en hipogastrio, muslo o cadera, que puede acentuarse con la marcha. A pesar de que suele afectarse el hueso subyacente, no requiere necesariamente

desbridamiento quirúrgico; el tratamiento antibiótico debe administrarse durante 4 semanas⁽¹³⁾.

Osteítis del pie. Es una entidad relativamente frecuente tras heridas punzantes en la planta del pie. Afecta a las pequeñas articulaciones y los huesos del pie, y se han descrito pacientes con calzado de suela de goma colonizada por *P. aeruginosa*, constituyendo la herida una puerta de entrada. La manifestación principal es el dolor en el pie, en ocasiones con celulitis superficial alrededor del sitio de punción y dolor con la palpación profunda de la herida. El desbridamiento quirúrgico precoz y el tratamiento antibiótico, 1-2 semanas con terapia parental o bien ciprofloxacino, han tenido buenos resultados^(13,39).

Osteomielitis por contigüidad. Se engloban bajo este término diversas situaciones; como la infección ósea posfractura (abierta o cerrada), la infección de material de osteosíntesis, la infección ósea secundaria a úlceras crónicas por vasculopatía o neuropatía la osteítis esternal secundaria a cirugía torácica y otras. En general puede decirse que es necesario el desbridamiento quirúrgico junto con el tratamiento antibiótico: los antibióticos más adecuados en esta situación incluyen la combinación de un aminoglucósido Más un β -lactámico antiseudomónico durante 4-6 semanas. El tratamiento combinado con ceftazidima y ciprofloxacino ha resultado efectivo⁽¹³⁾.

5.4.4. Infecciones del Sistema Nervioso Central.

Son poco comunes las infecciones del SNC por *P. aeruginosa*. La afectación del SNC casi siempre es consecuencia de procedimientos quirúrgicos o traumatismo cefálico. En general se presentan en pacientes con factores predisponentes que le favorecen el acceso al SNC:

- Inmunodepresión (pacientes con cáncer, VIH-SIDA, quemados).
- Manipulación (cirugía, catéteres de presión intracraneal, punción lumbar, catéteres de derivación ventriculoperitoneal).
- Infección contigua (otitis, mastoiditis, sinusitis).
- Traumatismo craneal.
- Siembra bacterémica desde un foco distante, etcétera.

P. aeruginosa puede producir meningitis, ventriculitis y abscesos cerebrales. Las manifestaciones clínicas de la meningitis como fiebre, cefalea y postración, son similares a las producidas por otras bacterias. El líquido cefalorraquídeo (LCR) en meningitis no difiere del que se encuentra en otras meningitis piógenas. La ceftazidima se considera el tratamiento de elección, ya que alcanza buenas concentraciones en LCR, también pueden utilizarse cefepime, meropenem, ciprofloxacino o aztreonam^(13,39).

5.4.5. Infecciones Cutáneas y Tejidos Blandos.

P. aeruginosa causa un conjunto de dermatitis: Foliculitis, Ectima Gangrenoso y Panadizo. Múltiples brotes vinculados con el uso de piscinas, baños públicos, tinas de hidromasaje. Para evitar los brotes epidémicos, debe controlarse su proliferación en el hogar y en sitios de recreo con la cloración apropiada del agua⁽³⁹⁾.

Foliculitis. Es un proceso de escasa gravedad, el contagio suele producirse a partir de agua contaminada, en especial en piscinas, pozos termales, jacuzzis y otros tipos de baño caliente. La concentración insuficiente de cloro (menor a 0.5 mg/L) permite la proliferación de *Pseudomonas*. El periodo de incubación oscila entre unas horas y 2 días. Se presenta con pápulas y pústulas foliculares acompañadas de prurito intenso (**Figura 13**): las localizaciones más frecuentes son el tronco y las extremidades inferiores. Tiende a involucionar de 8 a 10 días espontáneamente⁽⁴¹⁾.



Figura 13. Paciente con foliculitis pseudomónica⁽⁴²⁾.

Ectima gangrenoso. Son lesiones cutáneas necróticas. La piel puede ser el punto de inicio de la infección. Es más frecuente en pacientes con inmunodeficiencias o enfermedades generales graves, pero puede presentarse en personas sanas. El número de lesiones es variable, inicia con una ampolla hemorrágica que evoluciona a una ulcera de 1-2 cm de

diámetro, rodeada de un halo eritematoso (**Figura 14**). Tiene una alta mortalidad. El tratamiento con ceftazidima intravenosa es el antibiótico de elección⁽⁴¹⁾.

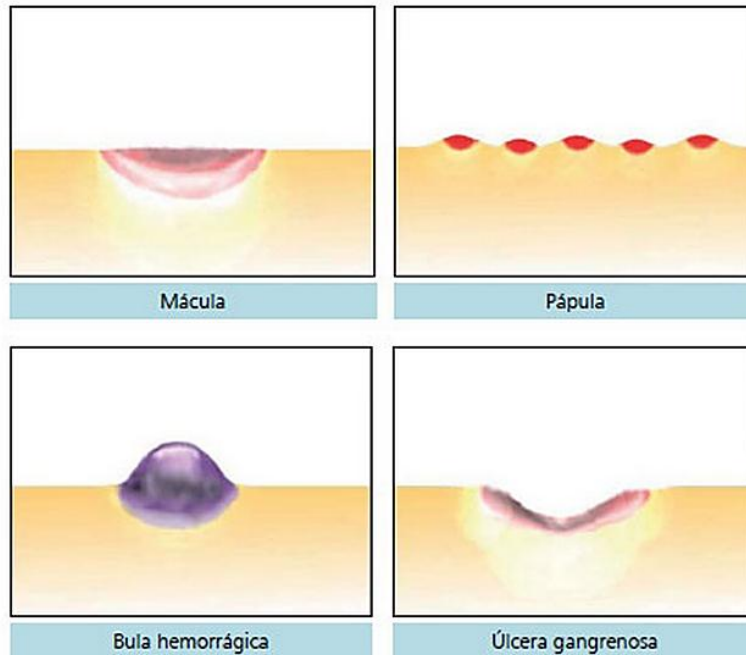


Figura 14. Progresión cutánea de las lesiones por *P. aeruginosa*⁽⁴⁰⁾.

Panadizo (Paroniquia Aguda). Se trata de una lesión secundaria a manicura excesiva o a pequeños traumatismos. Los gérmenes involucrados son *Staphylococcus aureus* y raramente *P. aeruginosa*. Suele afectar un solo dedo de las manos: se inicia con la inflamación del repliegue ungueal, que al cabo de uno o dos días produce supuración en zonas (**Figura 15**). Puede haber linfangitis y adenopatías axilares acompañantes, origina un dolor intenso de carácter punsátil⁽⁴³⁾.



Figura 15. Caso de paroniquia, color característico debido a la presencia de piocianina⁽⁴⁴⁾.

5.4.6. Infecciones de las Vías Respiratorias.

P. aeruginosa causa infecciones crónicas de las vías respiratorias en presencia de diversas enfermedades o situaciones predisponentes⁽³⁹⁾:

- Neutropenia.
- Ventilación mecánica.
- Uso de antibióticos previos.
- Exploración fibrobronoscópica.

Las infecciones respiratorias más frecuentes son: Neumonía Asociada a la Ventilación Mecánica, Infecciones Pulmonares en pacientes con Fibrosis Quística y la Neumonía de la Comunidad.

Neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV). Éste microorganismo suele producir neumonía tardía (más de 4 días desde la intubación orotraqueal) en pacientes sometidos a ventilación mecánica, siendo el agente más frecuente en esta situación. El deterioro de los mecanismos de defensa del paciente y la colonización por microorganismos patógenos de la orofaringe, predisponen al paciente críticamente enfermo al desarrollo de NAV. Los microorganismos llegan al epitelio de vías respiratorias bajas, se adhieren a la mucosa y causan infección, a través de los siguientes mecanismos:

- Aspiración de secreciones colonizadas procedentes de la orofaringe, o directamente o en forma secundaria, mediante el reflujo del contenido del estómago a la orofaringe y de allí al aparato respiratorio.
- Extensión de una infección por contigüidad.
- Acarreo por vía hematógena de microorganismos de otro sitio al pulmón.
- A través de la inhalación de aire contaminado o aerosoles médicos^(13,45).

En este caso el tubo de polivinilo actúa como cuerpo extraño y *P. aeruginosa* produce un glicocalix que crea un microambiente protector en el cual la penetración de los antibióticos es pobre⁽¹³⁾.

Clínicamente la neumonía es indistinguible de la producida por otros patógenos. En pacientes con infecciones por bacilos Gram negativos debe utilizarse terapia combinada: una cefalosporina anti-*Pseudomonas* (ceftazidima o cefepime) o un carbapenémico o un β -

lactámico con un inhibidor de β -lactamasas (piperacilina/tazobactam), más una fluoroquinolona antipseudomonas (ciprofloxacino o levofloxacino) o un aminoglucósido (amikacina, gentamicina o tobramicina)^(13,45).

Neumonía Adquirida en la Comunidad. Es una entidad poco frecuente. Los factores predisponentes asociados son la presencia de patología broncopulmonar previa (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasias), la hospitalización previa, neoplasia, infección por el virus de inmunodeficiencia adquirida y el tratamiento crónico con glucocorticoides. La mayoría de las veces se trata de una infección grave que puede ser rápidamente progresiva con una mortalidad de hasta el 33%⁽¹³⁾.

Fibrosis Quística (FQ). Es una enfermedad genética autosómica recesiva causada por una mutación en el gen *cftr* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), este gen codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembranal de FQ con múltiples puntos de fosforilación que regulan el flujo de electrolitos y agua. La alteración de esta función produce una modificación en la cantidad y composición de los fluidos epiteliales dando lugar a una disminución del contenido de agua de las secreciones y su consecuentemente espesamiento, las cuales obstruyen los canales por donde se transportan condicionando un compromiso multisistémico, crónico y progresivo, con manifestaciones secundarias de infección e inflamación con daño de los aparatos respiratorio, digestivo, reproductivo y de glándulas sudoríparas⁽⁴⁶⁾.

Es una enfermedad que produce insuficiencia pancreática y enfermedad pulmonar obstructiva crónica progresiva: uno de los problemas que afecta a estos pacientes son las infecciones pulmonares de repetición, inicialmente producidas por *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* y más tardíamente por *P. aeruginosa*; se postula que el 70-80% de los pacientes con fibrosis quística están infectados crónicamente por esta bacteria, esto condiciona el deterioro en la función respiratoria con la consiguiente morbimortalidad.

En el enfoque terapéutico varía según la situación clínica y la colonización de *P. aeruginosa*:

- Pacientes no colonizados: la administración de aminoglucósido inhalado puede retrasar la colonización.
- Pacientes colonizados: el tratamiento con tobramicina nebulizada (300mg dos veces al día) parece que mejora los parámetros funcionales pulmonares (capacidad vital

forzada, volumen espiratorio forzado en el primer segundo) y disminuye la carga bacteriana

- Pacientes con exacerbaciones agudas en las que el tratamiento estándar aceptado es la administración de un β -lactámico antipseudomónico más un aminoglucósido durante 10-14 días alternando con pautas de ciprofloxacino oral⁽¹³⁾.

5.4.7. Infecciones Oculares.

Las infecciones oculares por *P. aeruginosa*: Queratitis y Endoftalmitis, ocurren sobre todo como consecuencia de la inoculación directa a los tejidos durante traumatismos o por lesiones superficiales por lentes de contacto. Las cepas que causan afectación ocular producen con mayor frecuencia elastasas, proteasas y exotoxinas; aun en el medio prácticamente avascular de la córnea, el humor acuoso y el vítreo, es capaz de proliferar rápidamente con la consiguiente destrucción ocular^(13,39).

Queratitis. *P. aeruginosa* es una de las principales causantes de queratitis bacteriana. Suele existir un antecedente traumático que produce la rotura de la superficie corneal y que permite la invasión. Los factores predisponentes son las lentes de contacto, tratamiento con corticoides tópicos, pacientes quemados o en coma con exposición de la córnea, por mala protección ocular. La infección se inicia por una úlcera central, que va aumentando de tamaño y se produce exudado grasoso con edema corneal; la progresión es rápida y puede ocasionar perforación debe considerarse una urgencia oftalmológica (**Figura 16**). El tratamiento de las úlceras en fase incipiente es la administración de aminoglucósidos tópicos; también puede añadirse tratamiento subconjuntival para asegurar una mayor concentración del aminoglucósido en la estroma corneal, la esclera y el humor acuoso; igualmente, puede emplearse por esta vía ceftazidima. En estos casos de diseminación intraocular se requiere tratamiento antibiótico parental⁽¹³⁾.



Figura 16. Úlcera corneal en paciente con queratitis por *P. aeruginosa* ⁽⁴⁷⁾.

Endoftalmitis. Es una entidad de curso fulminante que amenaza la función del ojo en pocas horas. La vía de acceso puede ser por inoculación postraumatismo, cirugía acular, perforación de úlceras corneales o bien por siembra hematógena. Clínicamente hay dolor, hiperemia conjuntival, edema palpebral, hipopión y disminución de la agudeza visual (**Figura 17**). El tratamiento antibiótico debe ser local con aminoglucósido (tópico, subconjuntival, intraocular) y sistémico con una penicilina antipseudomónica: La alternativa del tratamiento, tanto local como parenteral, con ceftazidima parece una buena opción⁽¹³⁾.

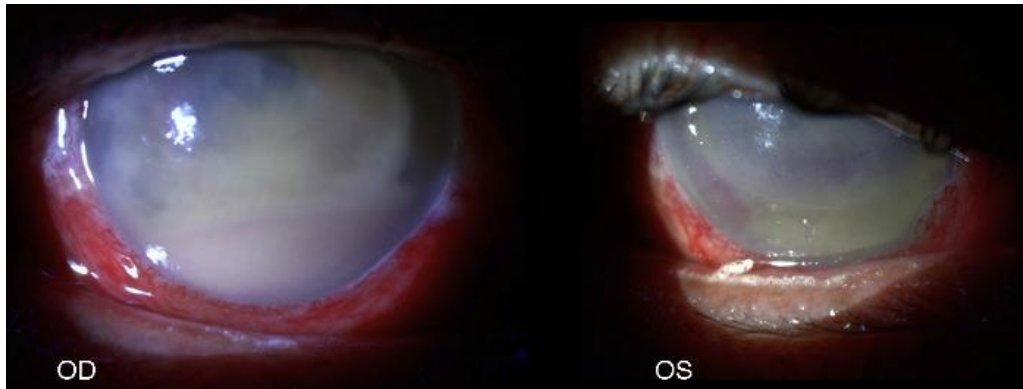


Figura 17. Endoftalmitis pseudomónica con presencia de hipopión casi total en ambos ojos⁽⁴⁸⁾.

5.4.8. Neutropenia Febril.

En la neutropenia febril, ha sido de manera histórica el microorganismo al cual es esencial dirigir el tratamiento. Los síndromes clínicos encontrados con mayor frecuencia incluyeron bacteremia, neumonía e infecciones en tejidos blandos que se manifestaron principalmente en forma de ectima gangrenoso.

Los neutrófilos constituyen el mecanismo de defensa normal del hospedador en contra de los microorganismos y se encuentran en pacientes con neutropenia febril; por tanto, deben de utilizarse dosis máximas de antibióticos β -lactámicos con actividad contra *Pseudomonas* para el tratamiento de la bacteremia en estas situaciones⁽³⁹⁾.

5.4.9. Infecciones del Oído.

Las infecciones óticas por *P. aeruginosa* varían desde modalidades leves hasta infecciones graves que ponen en riesgo la vida con secuelas neurológicas, entre las cuales se encuentran: Otitis Externa, Otitis Externa Maligna, Otitis Media Aguda y Mastoiditis. ⁽³⁹⁾.

Otitis Externa. La piel del conducto auditivo cartilaginoso contiene folículos pilosos, glándulas sebáceas, y glándulas apocrinas que se conforman la unidad apopilosebacea que tienen la función de producir cerumen. El cerumen constituye una barrera mecánica para insectos y cuerpos extraños. Por su composición forma también una barrera química que protege la piel del conducto auditivo a través de compuestos como lisozimas y mediante una capa acida que genera un ambiente inhóspito para los patógenos ⁽⁴⁹⁾.

La entidad más frecuente producida es la otitis externa aguda. Suele producirse en individuos con el conducto auditivo colonizado, en situaciones de humedad local o pequeños traumatismos, favorecen la aparición de una otitis externa, se manifiesta por dolor, eritema y secreción ótica (**Figura 18**), su pronóstico es bueno, y precisa tratamiento tópico con antibiótico (gentamicina), glucocorticoides y ácido acético⁽¹³⁾.



Figura 18. Paciente con otitis externa causada por *P. aeruginosa*⁽⁵⁰⁾.

Otitis Externa Maligna. Se presenta en pacientes debilitados con enfermedades de base, clásicamente diabetes mellitus tipo 2. Produce la invasión desde el conducto auditivo externo a los tejidos adyacentes circundantes, como tejido celular subcutáneo circundante, cartílago, mastoides y resto del hueso temporal. Sin un tratamiento adecuado, el proceso avanza hasta producir infección meníngea y en el parénquima cerebral. Su curso es subagudo, con otalgia y otorrea y no siempre aparece fiebre; la afectación neurológica inicial más frecuente es la parálisis del nervio facial: La exploración física del conducto auditivo externo muestra edema, eritema y tejido de granulación denso, que a veces hace imposible la exploración del conducto (**Figura 19**). El tratamiento debe ser combinado con antibióticos y cirugía que comporte limpieza y desbridamiento. Tradicionalmente se ha utilizado el tratamiento antibiótico combinado con un β -lactámico más un aminoglucósido, de 4-8 semanas en función de la extensión de la infección. En fases menos avanzadas la monoterapia con ceftazidima o ciprofloxacino durante 6 semanas es buena opción⁽¹³⁾.



Figura 19. Otitis externa maligna con ectima gangrenoso⁽⁵¹⁾.

Otitis Media Aguda. Los lactantes durante las 6 primeras semanas de vida pueden padecer otitis media aguda producida por bacilos Gram negativos. En estos casos, la terapia antibiótica debe administrarse por vía sistémica durante unas 2 semanas para evitar recurrencias. En los niños mayores, en los que la otitis media aguda requiera timpanostomía, la administración tópica de ciprofloxacino/dexametasona es buena opción terapéutica⁽¹³⁾.

Otitis Media Crónica. *P. aeruginosa* es uno de los principales causantes de otitis media crónica supurativa tanto en niños como adultos. El tratamiento quirúrgico (timpanomasteidectomía) puede obviarse con terapia antibiótica eficaz, ceftazidima, ciprofloxacino, durante 2-3 semanas, siempre y cuando no exista un colesteatoma: en casos de alergia a los β -lactámicos o imposibilidad de administrar quinolonas, el tratamiento con aztreonam ha tenido resultados similares⁽¹³⁾.

Mastoiditis. Se presenta con cuadro caracterizado por otalgia, fiebre y otorrea, puede ocurrir abombamiento del tímpano y pared posterior del conducto auditivo externo y edema retroauricular con desplazamiento de pabellón auricular (**Figura 20**)⁽⁵²⁾.



Figura 20. Paciente con mastoiditis⁽⁵³⁾.

La mastoiditis suele producirse en el contexto de una otitis externa maligna o una otitis media (niños). La afectación de la mastoides se produce por contigüidad. Es habitual observar perforación de la membrana timpánica y en ocasiones, parálisis del nervio facial. El tratamiento consiste en desbridamiento quirúrgico, así como la misma pauta terapéutica recomendada para la otitis externa maligna. En el caso de mastoiditis secundaria a otitis media aguda en niños se ha descrito curación de hasta el 90% con tratamiento antibiótico⁽¹³⁾.

5.4.10. Infecciones del Aparato Gastrointestinal.

P. aeruginosa puede producir patología en cualquier parte del tubo digestivo: Enterocolitis Necrosante e Infección Perianal, aunque a menudo la infección es clínicamente inaparente: la colonización del aparato gastrointestinal es común en pacientes ingresados con nutrición enteral, cirugía previa, endoscopia, ventilación mecánica, antibiótico de amplio espectro, etc. En pacientes inmunodeprimidos (especialmente recién nacidos y pacientes hematológicos con granulocitopenia), la colonización del tubo digestivo puede ser la puerta de entrada de la bacteremia, sin que haya necesariamente signos clínicos abdominales.

Enterocolitis Necrosante. En niños pequeños y pacientes con granulocitopenia *P. aeruginosa* puede producir colitis necrosante grave con ulceraciones en el íleon terminal y el colon e invasión secundaria de la submucosa y capa muscular, responsables de la perforación y sepsis. El cuadro se manifiesta con fiebre, dolor abdominal, deposiciones ocasionales sanguinolentas, distensión abdominal, etc. Otros enteropatógenos como *Klebsiella spp.* y *Escherichia coli*, pueden producir un cuadro similar. El tratamiento consiste en soporte hidroelectrolítico, antibióticos y, si cabe cirugía.

Infección perianal. Se describe en paciente granulocitopénicos, en ocasiones con poca expresividad clínica local al estar disminuida la respuesta inflamatoria. Tiende a extenderse a estructuras vecinas, como perineo, fosa isquiorrectal y retroperitoneo, y también a originar bacteremia. En general, el tratamiento médico de la infección perianal con antibióticos es suficiente en la mayoría de los casos⁽¹³⁾.

5.4.11. Sepsis.

Debe sospecharse la etiología de un agente bacteriano oportunista en situaciones clínicas que presenten ectima gangrenoso, neutropenia y manifestaciones gastrointestinales; debiendo iniciarse tratamiento antimicrobiano empírico con cobertura para este patógeno en forma precoz.

Es frecuente el desarrollo de ectima gangrenoso en pacientes inmunocompetentes, esto se debe, presumiblemente, a que es necesario un sistema inmune adecuado para desarrollar el intenso proceso de inflamación y de necrosis hemorrágica, características de esta entidad.

La neutropenia corresponde a un estado transitorio que está vinculado a la acción de las toxinas, ocurriendo además un fenómeno de inmunosupresión transitoria producto de la actividad supresora de los linfocitos y neutrófilos por parte de la cápsula de polisacáridos y por la inhibición de la quimiotaxis y función de los neutrófilos a través de las elastasas A y B, producidas por la bacteria.

Las manifestaciones gastrointestinales van desde una gastroenteritis leve hasta un compromiso grave de todo el tubo digestivo, con isquemia, necrosis y perforación del íleon distal, colon y recto⁽⁴⁰⁾.

5.5. Diagnóstico de Laboratorio.

5.5.1. Recolección y transporte de la muestra.

Tabla . Tipo de muestra y su procesamiento según la manifestación clínica en diagnóstico microbiológico de *P. aeruginosa*^(38,39,45,54-57).

| Manifestación clínica | Muestra biológica | Obtención de muestra | Procedimiento | Interpretación de resultados |
|---|--|---|----------------------------------|---|
| Bacteremia relacionada a catéter | Sangre | Catéter Punción periférica | Hemocultivo central y periférico | Hemocultivos positivos: Identificación temprana de hemocultivo central 2 horas antes que el periférico (método cualitativo). Diferencia de 3 a 5 veces mayor en hemocultivo central con respecto al periférico (método cuantitativo). |
| | Catéter | Segmento de 5 cm | Cultivo | Crecimiento de >15 UFC (método semicuantitativo) >102 UFC método cuantitativo ⁶ . |
| | Exudado | Muestra del drenaje | Cultivo Tinción de Gram | ---- |
| Endocarditis | Sangre | --- | Hemocultivo | ---- |
| Infecciones en vías urinarias | Orina | Chorro medio Cateterismo vesical Aspiración suprapúbica | Cultivo | >100,000 UFC/mL Gram negativo >10,000 UFC/mL Gram positivo 10,000mL UFC/mL 1,000 UFC/mL. |
| Infecciones asociadas a dispositivos ortopédicos | Líquido sinovial Tejido peri-implante | Punción articular 3 muestras de tejido (membrana, tejido blando y/o hueso) | Cultivo | ---- |
| | Sangre | | Hemocultivo | |

...Continuación **Tabla 9.** Tipo de muestra y su procesamiento según la manifestación clínica en diagnóstico microbiológico de *P. aeruginosa* (38,39,45,54-57).

| Manifestación clínica | Muestra biológica | Obtención de muestra | Procedimiento | Interpretación de resultados |
|---|---|--|--|--|
| Meningitis | LCR | Punción lumbar | Tinción de Gram Examen físico Examen microscópico Examen químico PCR Aglutinación de látex Determinación de proteína C reactiva. | Presencia de leucocitos (>6 células/mL). Apariencia turbia 1000-10000 cel/mL Neutrófilos >60 % Concentración de glucosa <45mg/dL Proteínas 50 g/dL Relación glucosa LCR/plasma <0.3. |
| Infecciones de piel y tejidos blandos | Abscesos cerrados Heridas abiertas Pus Tejidos | Aspiración con jeringa y aguja de la pus. Frotar con torunda de algodón un área de 1 cm ² Aspiración con jeringa y aguja Biopsia | Tinción de Gram Cultivo cualitativo Cultivo semicuantitativo Cultivo cuantitativo | Cultivo semicuantitativo (>1,000,000 UFC/g) Cultivo cuantitativo () Herida quirúrgica >15 UFC/placa Crecimiento entre 30 y 300 colonias de un único morfotipo. |
| Neumonía asociada a ventilación mecánica | Secreción bronquial Lavado bronqueoalveolar | Aspirado | Tinción de Gram Evaluación de celularidad Cultivo semicuantitativo Cultivo cuantitativo | Polimorfonucleares y bacterias Leucocitos/células epiteliales Crecimiento moderado-alto >100,000 UFC/mL 104 UFC/mL. |

No se requieren consideraciones especiales para la recolección y el transporte de las muestras.

5.5.2. Métodos de detección directa

En la tinción de Gram de las muestras aparecen como bacilos Gram negativos medianos y rectos⁽¹¹⁾.

También existen pruebas de detección directa rápida con anticuerpos fluorescentes para identificar antígenos en improntas, extendidos y secciones de tejidos.

Las improntas deberán prepararse siempre a partir de biopsias transbronquiales y a pulmón abierto⁽⁷⁾.

5.5.3. *Cultivo*

Crece bien en medios comunes como agar sangre de carnero al 5% y agar chocolate. Crece bien en los caldos de los sistemas de hemocultivo y en los caldos nutritivos comunes, como el tioglicolato y la infusión de cerebro y corazón⁽¹¹⁾.

Agares selectivos:

Agar Cetrimida: es un medio de aislamiento para la detección de *P. aeruginosa* a partir de muestras de origen diverso. El agar Cetrimida estimula la producción de piocianina y fluoresceína. Su formulación se basa en una optimización del medio King A: la adición de un amonio cuaternario inhibe el crecimiento del resto de microorganismos⁽⁵⁸⁾.

chromID™ *P. aeruginosa*

La identificación directa se basa en la coloración específica violeta de las colonias que producen aminopeptidasa. Provee una rápida detección antes de su conversión en fenotipo mucóide, así como un temprano tratamiento agresivo mediante los antimicrobianos apropiados, contribuye activamente a limitar la gravedad de la infección (**Figura 28**)⁽⁵⁹⁾.

5.5.4. *Condiciones y duración de la incubación.*

El crecimiento en agar sangre y chocolate en dióxido de carbono o aerobiosis, se observa dentro de las 24 a 48 horas posteriores a la siembra⁽¹¹⁾.

El crecimiento en agar MacConkey que solo debe cultivarse en aerobiosis a 35 °C, también se detecta en ese mismo lapso: en medios de cultivos selectivos puede requerirse la incubación a 35 °C en aerobiosis durante 72 hrs. para detectar desarrollo⁽¹¹⁾.

5.5.5. Aspecto de las colonias.

Tabla 10 Morfología colonial de *P. aeruginosa* en agares representativos^(1,11,59,61).

| Agar | Morfología colonial |
|--|---|
| Sangre | Esparcidas y planas, con bordes dentados; desarrollo confluyente, a menudo muestran un brillo metálico; pigmentación verde azulada, roja o parda; las colonias a menudo son β -hemolíticas (Figura 21); olor a uvas o a harina de maíz; las colonias mucoides se ven en muestras provenientes de pacientes con fibrosis quística (Figura 22). |
| Mueller-Hinton | Colonias de diámetro de 3 a 4 mm, color verde azulado que difunde en el agar (Figura 23). |
| Medio King A | Producción de piocianina. |
| Medio King B | Producción de pioverdina. |
| MacConkey | Colonias, redondas, incoloras, no fermentadoras de lactosa (Figura 24). |
| Cetrimida | Colonias redondas, lisas, de borde regulares que presentan una pigmentación verde espontánea y fluorescencia verde bajo luz ultravioleta (Figura 26). |
| Medio Hugh-Leifson | Producción de ácido por oxidación de la glucosa. (Figura 27) |
| Siembra en Agar hierro de Kligler (KIA) | Imagen alcalina de color rojo en todo el tubo, SH ₂ Negativo, gas Negativo. |



Figura 21. Colonias de *P. aeruginosa* color gris verdoso de 6 a 8 mm de diámetro en placa de agar sangre, se observa hemolisis β ⁽¹⁾.

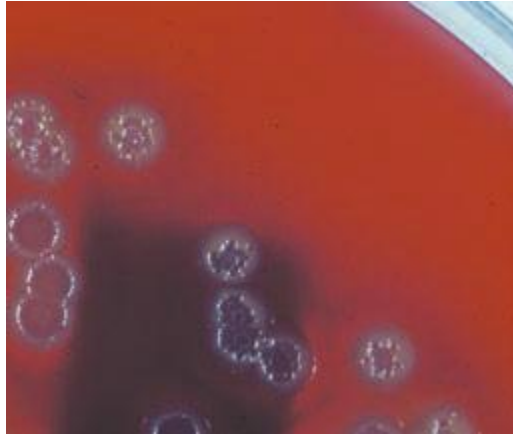


Figura 22. Morfotipo mucoso de *P. aeruginosa*: Colonias secas de tono plateado en placa de agar sangre, no se observa hemólisis⁽¹⁾.

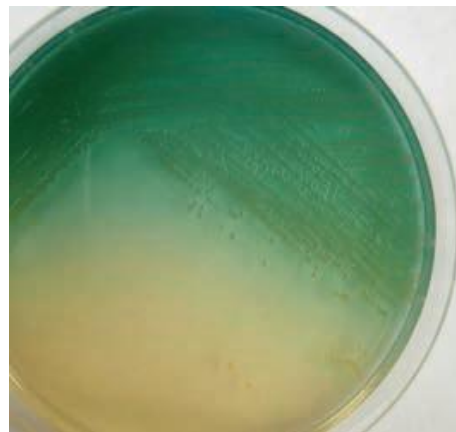


Figura 23. Cultivo de *P. aeruginosa* en agar Mueller-Hinton⁽¹⁾.



Figura 24. Cultivo de *P. aeruginosa*, En agar MacConkey (izquierda) se observan colonias de color rojo pardo, Lactosa (-), sin embargo un crecimiento de cepas mucoides no exhibe tales características (derecho) ⁽¹¹⁾.



Figura 25. *P. aeruginosa* en agar Tripticasa de soya muestra un color azul verdoso (izquierdo) ⁽¹¹⁾.



Figura 26. Cultivo de *P. aeruginosa* en agar cetrimida ⁽⁵⁹⁾.



Figura 27. Reacción oxidación fermentación en medio Hugh-Leifson. Acidificación oxidativa de la glucosa en aerobiosis (izquierda). Ausencia de crecimiento en anaerobiosis (derecha) ⁽⁶¹⁾.



Figura 28 Crecimiento de colonias de *P. aeruginosa* en agar chromID™ *P. aeruginosa*⁽⁵⁹⁾.

5.5.6. Métodos de identificación.

Un esquema fiable para la identificación incluye las pruebas y características convencionales siguientes:

- Producción de oxidasa.
- Agar inclinado TSI con reacción alcalina/sin cambios (K/NC)
- Buen crecimiento a 42 °C.
- Producción de pigmento brillante de color verde azulado, rojo o castaño, difusible en agar de Mueller-Hinton o agar Soya tripticasa.
- Alcalinización de acetamida.
- Desnitrificación de nitratos y nitritos.
- Móviles con flagelo polar y monotrico^(7,11).

El diagnóstico de la especie es muy complejo, comprende un gran número de pruebas que van desde el número de flagelos, actuación sobre azúcares y aminoácidos, crecimiento a diferentes pH, temperatura y salinidad disgenésicos, etc., hasta la acumulación intracelular de β -hidroxibutirato como fuente de carbono, que es el criterio internacional de separación en secciones de este género⁽⁶⁾.

Tabla 11. Pruebas bioquímicas características de diversas especies de *Pseudomonas*⁽⁶²⁾.

| Test | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. cepacia</i> | <i>P. fluorescens</i> | <i>P. mallei</i> | <i>P. maltophilia</i> | <i>P. paucimobilitis</i> | <i>P. pickettii</i> | <i>P. pseudomallei</i> | <i>P. putida</i> | <i>P. stutzeri</i> | <i>P. vesicularis</i> |
|--|----------------------|-------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|
| Motilidad | + | + | + | - | + | V | V | + | + | + | V |
| Crecimiento a 37 C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento de 20-22 C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pigmento café | V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pigmento violeta | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pigmento verde | V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pigmento amarillo | - | - | - | - | - | + | - | - | - | V | - |
| Pigmento naranja | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Crecimiento en agar MacConkey | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | V |
| Oxidasa | + | + | + | - | V | + | + | + | + | + | + |
| Oxidación en medio O-F | + | + | + | + | V | V | + | + | + | V | - |
| Alcalinización en medio O-F | - | - | - | - | V | - | - | - | - | - | - |
| Reducción de nitratos a nitritos | + | V | V | + | V | - | V | + | - | + | - |
| Citrato en medio Simmons | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - |
| Citrato de medio Christensen | + | + | + | V | + | V | + | + | + | + | - |
| Ureasa | V | V | V | V | - | - | + | V | V | V | - |
| Producción de gelatinasa | + | V | V | V | + | - | V | + | - | - | V |
| Crecimiento en medio KCN | V | V | V | - | V | - | - | + | V | - | - |
| H ₂ S (papel PbAc) | - | - | - | - | V | - | - | - | - | - | - |
| Gluconato | V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Malonato | + | V | V | - | V | - | - | - | V | V | - |
| ONPG | - | V | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Formación ácido a partir de 10% Glucosa | + | + | V | - | - | - | + | + | + | V | - |
| Formación ácido a partir de 10% lactosa | V | + | V | V | - | - | + | + | V | - | - |
| Formación ácido a partir de Glucosa (en medio de peptona) | - | V | V | V | - | - | - | + | V | - | - |
| Formación ácido a partir de Glucosa (en medio con sales de amonio) | + | + | + | + | V | + | + | + | + | + | + |
| Adonitol | - | + | V | - | - | - | - | V | - | - | - |
| Arabinosa | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | V |
| Celobiosa | - | + | V | V | - | + | + | + | - | - | V |
| Dulcitol | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Etanol | + | - | V | - | - | + | - | V | V | V | + |
| Fructosa | + | + | + | V | V | + | + | + | V | + | - |
| Glicerol | + | + | V | + | - | V | + | + | V | V | - |
| Inositol | - | + | V | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Lactosa | - | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - |
| Maltosa | - | + | - | V | + | + | + | + | - | V | + |
| Manitol | + | + | V | V | - | - | V | + | - | V | - |
| Rafinosa | - | V | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ramnosa | - | - | V | - | - | V | - | - | - | - | V |
| Salicin | - | + | - | - | - | V | - | - | - | - | - |
| Sorbitol | - | + | V | V | - | - | - | + | - | - | - |
| Sucrosa | - | V | V | - | - | + | - | V | - | - | - |

..Continuación **Tabla 11** Pruebas bioquímicas características de diversas especies de *Pseudomonas*⁽⁶²⁾.

| Test | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. cepacia</i> | <i>P. fluorescens</i> | <i>P. mallei</i> | <i>P. maltophilia</i> | <i>P. paucimobilis</i> | <i>P. pickettii</i> | <i>P. pseudomallei</i> | <i>P. putida</i> | <i>P. stutzeri</i> | <i>P. vesicularis</i> |
|---------------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|
| Trealosa | V | + | V | + | - | + | V | + | - | - | - |
| Xilosa | + | + | + | - | - | + | + | V | + | V | - |
| Fenilalanina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arginina dihidrolasa | + | - | + | + | - | - | - | + | + | V | - |
| Lisina descarboxilasa | - | V | - | - | V | - | - | - | - | - | - |
| Ornitina descarboxilasa | - | V | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Reducción de selenito | V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hidrolisis de caseína | + | + | V | - | + | - | - | + | - | - | - |
| Producción de desoxirribonucleasa | V | - | - | - | + | V | - | - | - | - | - |
| Arginina Thornley | + | - | + | + | - | - | - | + | + | V | - |
| Hidrolisis de Tween 20 | + | + | V | + | + | + | + | + | V | + | + |
| Hidrolisis de Tween 80 | + | + | V | V | + | + | + | V | - | + | V |
| Hidrolisis de tirosina | + | + | + | + | + | + | + | + | + | V | V |
| Tirosina, pigmento café | V | - | V | - | + | V | - | - | V | V | + |
| Reducción de nitritos | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Crecimiento de PHBA | + | + | + | + | V | + | + | + | + | + | + |
| Acumulación de PHBA | - | + | - | + | - | + | + | + | - | - | + |
| Hidrolisis de bilis-esculina | V | V | - | - | V | + | - | V | - | - | - |
| Crecimiento en presencia de cetrimida | + | V | + | - | V | - | - | V | + | V | - |
| Fluorescencia-medio King's | V | - | V | - | - | - | - | - | V | - | - |
| Crecimiento a 5 C | - | - | V | - | - | - | - | - | V | V | - |
| Crecimiento a 42 C | + | V | - | V | V | - | V | + | - | + | - |
| Producción de 3-cetolactosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Producción de lecitinasa | + | + | V | V | V | - | V | + | - | V | - |
| Hidrolisis de almidón | - | - | - | - | - | v | - | - | - | d | - |

Las cepas mucoides aisladas en pacientes con fibrosis quística pueden no exhibir el pigmento característico y reaccionar con mayor lentitud en las pruebas bioquímicas estándares, es conveniente conservar los cultivos hasta 7 días antes de considerarlos negativos. Esta actividad lenta es lo que a menudo ocasiona que impide la identificación de con los sistemas comerciales⁽¹¹⁾:

- Sistemas estandarizados para la identificación mediante pruebas bioquímicas, por ensayos de bacteriología analítica y procesos que involucran al genoma bacteriano: Oxi-FERM, API 20E, API 20NE, Sistema Remel N/F, sistema Crystal enteric/Nonfermenter (**Tabla 13**)^(60,63).
- Métodos automáticos para la identificación de bacterias no fermentadoras como *P. aeruginosa*:

- a. Sistema Vitek Legacy.
- b. Sistema Vitek 2.
- c. Sistemas Microscan Walkaway-96, Walkaway-40 y Autoscan 40
- d. Sistema sensitive AP80
- e. Sistema Phoenix⁽⁷⁾.

Tabla 12. Sistemas estandarizados para la identificación de *P. aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas^(7,64).

| Sistema estandarizado | Compañía | Descripción | Pruebas | Ventajas y/o desventajas |
|----------------------------------|------------------|---|---|---|
| Tubo Oxi/Ferm^c | Becton Dickinson | Consiste en un tubo de plástico con compartimentos, compuesto por 8 pruebas convencionales para la identificación de Gram negativos oxidativos-fermentativos (OF). | OF anaerobia de dextrosa, arginina dihidrolasa, producción de gas nitrógeno, SH ₂ e indol (ambos se leen en el mismo compartimento, OF de xilosa, OF aeróbica de dextrosa, urea y citrato de Simmons. | Su diseño limita el crecimiento óptimo de los microorganismos aerobios estrictos. La cantidad de inóculo es pequeño por lo que hace difícil detectar los productos bioquímicos de los no fermentadores. |
| API 20E | Biomérieux. | Diseñado para la identificación de enterobacterias, consiste en una banda de plástico con 20 cápsulas miniaturizadas que contienen sustratos deshidratados y una cámara de incubación de plástico. Genera un perfil de 9 números. | ONPG, Arginina dihidrolasa, Lisina descarboxilasa, Ornitina descarboxilasa, citrato, sulfuro de hidrogeno, ureasa, Triptófano desaminado, Indol, Voges-Proskauer, Gelatina, Glucosa, Manitol, Inositol, Sorbitol, Ramnosa, Sacarosa, Melobiosa, Amigdalina, Arabinosa. | En la identificación de <i>P. aeruginosa</i> es confiable en un 99%, sin embargo para otros no fermentadores se han reportado fallas debido a reacciones falsas negativas sobre todo de citrato y licuefacción de gelatina. |
| API 20 NE | Biomérieux. | Es una modificación del API 20E. Está compuesto por 8 pruebas convencionales, 12 pruebas de asimilación y una base de datos para identificar al microorganismo. Genera un perfil de 7 dígitos. | PRUEBAS BIOQUÍMICAS: NO: Reducción de nitrato, TRP: triptófano, GLU: glucosa, ADH: Arginina dihidrolasa, UREA: Ureasa, ESC: Hidrolisis de esculina, GEL: gelatina, PNP: β-galactosidasa PRUEBAS DE ASIMILACIÓN: GLU: D-Glucosa, ARA: L-Arabinosa, MNE: D-manosa, MAN: manitol, MAL: maltosa, GNT: D-gluconato, CAP: Caprato, ADI: adipato, MLT: L-Malonato, CIT: citrato, PAC: fenilacetato. | La base de datos está construida de acuerdo con las reacciones obtenidas a una temperatura de incubación de 30 C (en lugar de los 35 C a 37 C convencionales). Se toman lecturas después de 48 horas de incubación. |

...Continuación **Tabla 12** Sistemas estandarizados para la identificación de *P. aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas^(7,64).

| Sistema estandarizado | Compañía | Descripción | Pruebas | Ventajas y/o desventajas |
|---|------------------|---|---|--|
| Sistema Remel N/F | Remel | Consta de 3 componentes, (1) Un tubo GNF estrangulado que detecta fermentación de glucosa y N ₂ (por debajo del estrangulamiento) y producción de fluoresceína en la porción inclinada (por encima del estrangulamiento). (2) Un tubo 42P no estrangulado se utiliza para evaluar el crecimiento a 42 C y la producción de pigmento de piocianina. (3) Una placa Uni N/F Tek circular que consiste en 11 pozos periféricos sellados en forma independiente que contienen agar convencional | Utilización de glucosa, xilosa, manitol, lactosa y maltosa, asimilación de acetamida, hidrolisis de esculina y urea, actividad de DNAsas y de ONPG, producción de indol y sulfuro de hidrogeno. | La placa Uni N/F está bien construida para evaluar la mayoría de los no fermentadores apoyan el crecimiento de cepas con requerimientos especiales, además permite visualizar directamente el crecimiento de las colonias. La capacidad de este sistema para detectar <i>P. aeruginosa</i> mediante el tubo GNF estrangulado y el tubo 42P no estrangulado ahorra tiempo. Existen problemas en la interpretación de la reacción de gas N, en el tubo GNF y la prueba de indol. |
| Sistema Crystal enteric/Nonfermenter | Becton Dickinson | Método de identificación miniaturizado que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos modificados. Comprende 1) La tapa BBL Crystal que contienen 30 sustratos deshidratados sobre los extremos de puntas de plástico. | Las reacciones incluyen fermentación oxidación, degradación e hidrolisis de distintos sustratos ligados a cromógenos. | Comparado con el APINE (41/45), el número de identificaciones correctas de <i>P. aeruginosa</i> (36/45). El tiempo de incubación es menor de 18 hrs. |

...Continuación **Tabla 12.** Sistemas estandarizados para la identificación de *P. aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas^(7,64)

| Sistema estandarizado | Compañía | Descripción | Pruebas | Ventajas y/o desventajas |
|------------------------------|----------|---|--|--|
| Sistema RapId NF Plus | Remel | Micrométodo que consiste en 10 cavidades de reacción en una bandeja de plástico. Contienen reactivos deshidratados. | Arginina dihidrolasa, Utilización de tiol alifático, Hidrolisis de triglicéridos, hidrolisis enzimática de glucósido o fosfodiéster ligado a sustratos nitrofenílicos libera <i>o</i> -nitrofenol p <i>p</i> -nitrofenol amarillo, Hidrólisis de urea, Utilización de glucosa, hidrólisis enzimática de sustrato ligado a β -naftilamina (prolina, pirrolidina, γ -glutamyl, triptófano, N-benzil-arginina) libera β -naftilamida que es detectada con el reactivo RapId NF Plus. Utilización triptófano con formación de indol. Reducción de nitrato de sodio. | Es el único sistema de prueba con un periodo de incubación de 4 horas, no automático, disponible para la identificación de no fermentadores. |

Las cepas de *P. aeruginosa* pueden ser caracterizadas mediante:

- Serotipia: Es compleja por las reacciones cruzadas que aparecen y el número limitado de serotipos existentes.
- Fagotipia o lisotipia: Es más sensible, pero la inestabilidad de los tipos la hace de dudosa aplicación.
- Piocinotipia: Es la técnica más utilizada y permite la diferenciación de gran cantidad de tipos (expresados con números arábigos) y subtipos (con letras minúsculas). Se usan unas cepas de referencia y se observa la inhibición de su crecimiento por la bacteriocina de la cepa problema; este método clásico se ha sometido a múltiples variantes que permiten un mejor tipado aun de las cepas; así, la piocinosensitipia, en la que las cepas indicadoras son las que producen la bacteriocina e inhiben o no la cepa problema. La piocianinotipia o clasificación por la producción de 2, 3, 4 o 5 pigmentos, mediante espectrofotometría infrarroja, no ha entrado en la práctica⁽⁶⁾.

5.6. Estructura del genoma.

Actualmente se encuentra disponible en línea la secuenciación del genoma de *P. aeruginosa*. Tal secuencia es de interés debido que proporciona idea del papel de esta bacteria como patógeno, y porque ofrece nueva información sobre la relación entre el tamaño del genoma, complejidad genética y versatilidad de esta bacteria⁽⁶⁵⁾.

Su genoma tiene 6,3 millones de pares de bases (mpb), es notablemente más grande que la mayoría de los 25 genomas bacterianos secuenciados (**Tabla 13**). Se han reportado arreglos genéticos en su extenso genoma, que incluyen la pérdida o adquisición de largos bloques de ADN, contribuyendo a las variaciones en el tamaño del genoma entre 5.2 y 7 mb^(65, 66).

Tabla 13. Tamaño de los genomas y número de genes de diversas bacterias⁽⁶⁷⁾.

| Especies | Tamaño de genoma (mb) | Número de genes |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------|
| <i>P. aeruginosa PAO1</i> | 6.26 | 5,700 |
| <i>Escherichia coli K12</i> | 4.64 | 4,400 |
| <i>Vibrio cholerae El Tor NI6961</i> | 4.03 | 4,000 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2.16 | 2,300 |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | 0.58 | 500 |

Se ha propuesto que el gran tamaño del genoma y la complejidad genética reflejan las adaptaciones evolutivas que le permiten prosperar en diversos nichos ecológicos(**Figura 29**). El análisis de la secuencia completa del genoma revela muchas pistas sobre la versatilidad de la bacteria y sus capacidades para transportar, metabolizar y crecer en numerosas sustancias orgánicas, sus sideróforos como sistemas de captación de hierro, y la capacidad mejorada para exportar compuestos (por ejemplo, enzimas y antibióticos) por un gran número de sistemas de flujo y la secreción de proteínas. *P. aeruginosa* potencialmente posee cuatro sistemas de quimiotaxis, al menos uno de los cuales contribuye a su capacidad de formar biofilms. Así, este organismo se puede mover fácilmente a las condiciones más favorables o consolidar y 'cavar' para la colonización persistente de un microambiente particular. En consonancia con su mayor complejidad genética, tiene el mayor porcentaje de genes dedicados a sistemas de mando y control (por ejemplo, sensores ambientales y reguladores

transcripcionales) observados en un genoma bacteriano. Estos genes reguladores presumiblemente modulan las diversas capacidades genéticas y bioquímicas de esta bacteria en condiciones ambientales cambiantes⁽⁶⁵⁾.

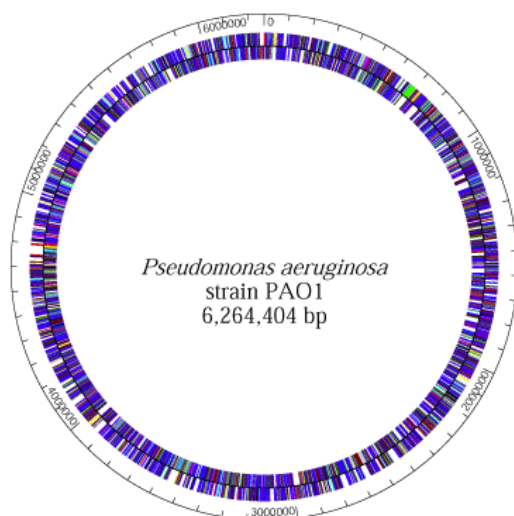


Figura 29. Genoma de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1⁽⁶⁸⁾.

El genoma comprende un mosaico de genes específicos de la especie que va del 70 al 90% de la secuencia de ADN de una cepa. Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad de información accesoria que cada cepa tiene, pero el orden de los genes propios de la especie está conservado entre todos los aislamientos. Estos bloques de ADN se interrumpen por secuencias específicas de cada cepa que pueden ser de entre 1 a 200 kb, conocidos como islas genómicas (GEIs, *genomic islands*), que son adquiridas por transferencia horizontal. Dependiendo de sus funciones son codificados y le confieren cierta ventaja en el estilo de vida de la bacteria. Se han descrito un largo número de GEIs en el cromosoma de *P. aeruginosa* (PAGI). Las Islas de patogenicidad (PAPI) son islas genómicas especializadas que codifican para factores de virulencia (**Tabla 14**). Los factores de virulencia son codificados en plásmidos o genes cromosómicos, como *lasB* (Codifica para elastasa), *toxA* (exotoxina A), *pilA* (fimbria tipo IV), *plcH* (fosfolipasa C), *phzA1* (biosíntesis de proteína fenazina), *toxR* (regulador transcripcional) y *lecA* (lecitina). Se sugiere que su patogenicidad es multifactorial, requiere la acción acumulativa (y coordinada) de múltiples factores, algunos componentes básicos del genoma y otros localizados en islas genómicas^(66,69-71).

Tabla 14. Islas de patogenicidad del genoma de *P. aeruginosa*^(66,70,72).

| Isla genómica | Tamaño | ORFs (open reading frames) | Cepa | Sitio de inserción | Función |
|--|---------------|-----------------------------------|-------------|---------------------------|--|
| PAGI-1 | 48, 893 bp | 51 | X24509 | PA2217 | Resistencia a estrés oxidativo. |
| PAGI-2 | 104, 955 bp | 111 | Cepa C | tRNA-Gly (PA2830) | Transporte de iones y metales pesados, biogénesis del Citocromo C, Resistencia al mercurio. |
| PAGI-3 | 103,304 bp | 106 | Cepa SG17M | tRNA-Gly (PA2830) | Transporte de aminoácidos, coenzimas y porfirinas. |
| PAGI-4 | 23.4 kb | ---- | Cepa C | tRNA-Lys (PA0976) | ----- |
| PAGI-5,-6,-7, -8, -9, -10, -11. | 99 bp 2 kb | 201 | | ---- | ----- |
| PAPI-1 | 107,899 | 115 | PA14 | tRNA-Lys (PA4541) | Posible efector tipo II. Pili tipo IV. Dos componentes del sistema regulador (pvrR/PA14_59800, rcsB/rcsC), bacteriocina (piocianina S5). |
| PAPI-2 | 10,722 | 15 | PA14 | tRNA-Lys (PA0976) | Exotoxina y su chaperonina (ExoU/SpcU). |
| Glycosylation | --- | -- | PAK | Flg/fliC | Glicosilación de flagelina. |
| ExoU island A | 81 kb | --- | 6077 | tRNA-Lys (PA0976) | Exotoxina y su chaperonina (ExoU/SpcU). |
| ExoU island B | 30 kb | --- | 19660 | tRNA-Lys (PA0976) | Exotoxina y su chaperonina (ExoU/SpcU). |
| ExoU island C | 4 kb | --- | X13273 | tRNA-Lys (PA0976) | Exotoxina y su chaperonina (ExoU/SpcU). |

La secuencia de los genes comunes está altamente conservada entre los distintos aislamientos de esta bacteria, a excepción del gen *piliA* que codifica para la fimbria tipo IV y que presenta un gran polimorfismo. De hecho la variabilidad de las secuencias específicas es 10 veces menor que la que presentan distintas cepas de *E. coli* o *Salmonella*, lo que sugiere una alta tasa de recombinación entre la población de esta bacteria. La alta frecuencia de recombinación entre las distintas clonas, comparada con la relativamente menor tasa de mutación espontánea, mantiene una información genética común a toda la especie. Contrariamente a lo que ocurre con otras bacterias patógenas, no existen clonas de asociadas

con el desarrollo de una enfermedad, por lo que la frecuencia de las distintas clonas es la misma entre los aislamientos ambientales y clínicos. Esto es, en una determinada región geográfica se encuentra que la frecuencia con la que se aísla una cepa es la misma si se muestrean hospitales, pacientes con distinto tipo de infecciones o se toman muestras ambientales. Sin embargo existe una gran variabilidad genética entre distintos aislamientos de esta bacteria aunque sean aisladas de la misma región, y se ha encontrado una alta frecuencia de rearrreglos génicos. Esta variabilidad tiene características muy particulares⁽⁶⁹⁾.

Ha sido secuenciado el genoma de *P. putida* KT2440, es una bacteria ambiental estrechamente relacionada con *P. aeruginosa*, al grado de que 85% del genoma de *P. putida* KT2440 tiene homólogos en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1. Sin embargo, existen diferencias notables, entre otras la ausencia en *P. putida* KT2440 de los genes que codifican para los principales determinantes de virulencia que en *P. aeruginosa* están regulados por la respuesta sensora de quorum, incluyendo a los ramnolípidos⁽⁶⁹⁾.

Las infecciones causadas por esta bacteria son particularmente difíciles de tratar debido a la resistencia intrínseca a los antibióticos. Parecería que, en el curso de la evolución ha desarrollado mecanismos para resistir compuestos antimicrobianos de origen naturales adquiriendo así la diversidad funcional necesaria para competir con otros microorganismos en una variedad de entornos. Los sistemas de flujo de salida que se han identificado podrían contribuir a esta resistencia intrínseca. Así mismo diversidad metabólica y capacidad de adaptación permiten que pueda prosperar y competir con otros microorganismos y probablemente contribuyen a su alta resistencia intrínseca a los antibióticos.

El conocimiento de la secuencia completa del genoma y sus procesos de codificación ofrecen información para el descubrimiento y explotación de nuevos antibióticos, la esperanza para el desarrollo de estrategias más eficaces para tratar las infecciones oportunistas causadas por *P. aeruginosa*, potencialmente mortales en seres humanos⁽⁶⁵⁾.

5.7. Plásmidos.

El cromosoma bacteriano contiene todos los genes necesarios para el crecimiento y la reproducción de la célula, virtualmente todas las células contienen moléculas de DNA adicionales conocidas como plásmidos⁽⁷³⁾.

Una gran variedad de plásmidos han sido aislados de algunas especies de *Pseudomonas*, como son los plásmidos con factor R, que inactivan ciertos antibióticos y plásmidos con factor S capaces de transferir sus genes de resistencia al cromosoma bacteriano⁽⁷⁴⁾.

Este microorganismo posee una enorme versatilidad metabólica, la cual parece deberse al gran número de genes cromosomales que codifican para enzimas con actividades novedosas. Los plásmidos que se presentan codifican para resistencias a antibióticos o a metales y su extensa distribución representa un problema clínico⁽⁷⁵⁾.

Debido a su naturaleza patógena de *P. aeruginosa*, existen diversos estudios para caracterizar su resistencia a antibióticos (**Tabla 15**). Han sido reportados en esta bacteria, plásmidos que median la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y penicilinas por medio de β -lactamasas, plásmidos que acarrean los genes para enzimas modificadoras de aminoglucósidos: Acetiltransferasas y fosfotransferasas. Así como plásmidos que le brindan resistencia cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclinas^(75,76).

Tabla 15 Propiedades de los R-plásmido de *Pseudomonas* que actúan inactivando la enzima específica para estos antibióticos⁽⁷⁶⁾.

| Plásmido | Grupo | Propiedades | Size (kb) |
|------------------------|----------------|-----------------------------|-----------|
| RP1, RP4, RK2 | P1 | Cb, Km, Tc, Tra* | 56.6 |
| pMG1 | P2 | Sm, Su, Gm, Hg, Mob* | 500 |
| RSF1010, Rlb679 | P3 | Cb, Gm, Su Tra* | 8.7 |
| Pms350 | P9 | Sp Sm, Su, Km, Cm | 49 |
| pSa | No Clasificado | Sp, Sm, Su, Km, Cm, Gm, Tra | 39 |

Cb:Carbenicilina, Km:Kanamicina, Tc:tetraciclina, Tra*: Representa la habilidad de autotransmitirse, Sm:Estreptomycin, Su:Sulfonamidas, Gm:Gentamicina, Hg:Mercurio, Mob*:Representa la habilidad de moverse por un plásmido conjugativo, Cm: Cloramfenicol, Sp:Espectinomycin.

Algunas *Pseudomonas* poseen plásmidos de resistencia para iones metálicos, pesticidas y luz ultravioleta (UV)(Tabla 16)⁽⁷⁶⁾.

Tabla 16. Plásmidos que confieren resistencia a iones metálicos en especies de *Pseudomonas*⁽⁷⁶⁾.

| Plásmido | Resistencia |
|--------------|-------------------------|
| pMR1, pMERPH | Cd, Co, Hg, Ar, Cr y Te |
| pCMS1 | Organofosforados |
| pMG2 | Luz UV |

Los plásmidos que codifican para la resistencia a metales pesados son aspectos importantes en la investigación ambiental, debido a sus potenciales usos en la fabricación de biosensores y procesos de biorremediación⁽⁷⁴⁾.

Una de las características de las bacterias del género es su gran capacidad para 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*.

Es interesante mencionar que si bien son frecuentes los plásmidos que confieren resistencia a antibióticos y metales pesados entre los aislamientos no lo son tanto como para considerar que estos elementos genéticos formen parte de su genoma. Por otra parte, no existen datos que sugieran que los plásmidos tengan un papel en la alta tasa de recombinación que presenta esta bacteria.⁽⁷⁶⁾.

5.8. Bacteriófagos.

Los bacteriófagos son virus que infectan a las bacterias, están formados por dos componentes básicos; proteína y ácido nucleico. La proteína forma una cubierta o cápside dentro de la cual está contenido el genoma de ácido nucleicos. El tamaño varía enormemente de alrededor de 1.6 Kb en los fagos más pequeños a más de 150 Kb (**Tabla 17**)⁽⁶⁷⁾.

Tabla 17. Características de algunos bacteriófagos típicos y sus genomas⁽⁶⁷⁾.

| Fago | Hospedero | Estructura de la cápside | Estructura del genoma | Tamaño del genoma | Número de genes |
|-------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------|
| PM2 | <i>P. aeruginosa</i> | Icosaédrica | RNA lineal, segmentado, bicatenario | 10 | Alrededor de 21 |
| λ | <i>E. coli</i> | Cabeza y cola | DNA líneal bicatenario | 49.5 | 48 |
| Φ X174 | <i>E. coli</i> | Icosaédrica | DNA circular monocatenario | 5.4 | 11 |
| f6 | <i>Pseudomonas phaseolicola</i> | Icosaédrica | RNA lineal, segmentado, bacteriano | 2.9, 4, 6.4 | 13 |
| M13 | <i>E. coli</i> | Filamentosa | DNA circular monocatenario | 6.4 | 10 |

El bacteriofago PM2 presenta doble cadena de DNA, cápside poliédrica y una placa basal con espinas. además posee una cápside rica en lípidos (**Figura 30**)^(76,77).

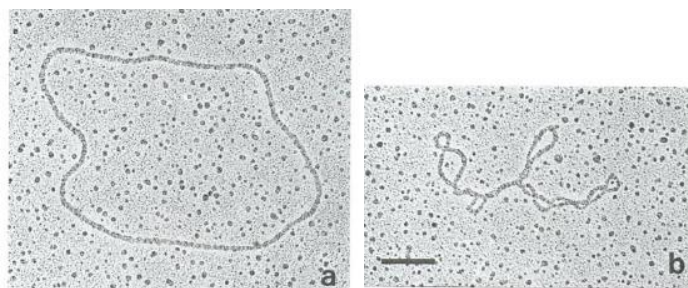


Figura 30. DNA del bacteriófago PM2 en su forma circular abierta (a) y superenrollada (b) la barra representa 0.2 μ ⁽⁷⁸⁾.

Se han observado un gran número de bacteriófagos. Actualmente están disponible en el *National Center for Biotechnology Information databases*, 38 genomas completos⁽⁷⁹⁾.

Dada su naturaleza infectiva y destructiva, los bacteriófagos han sido utilizados en la terapia contra algunas bacterias, actualmente se consideran una alternativa de tratamiento debido a la crisis acelerada de la resistencia a antibióticos, sin embargo diversos obstáculos se oponen tales como:

- La contaminación de las reservas de bacteriófagos con toxinas y desechos bacterianos que causan síntomas variables entre fiebre y la muerte de pacientes
- El rango de hospedador es estrecho de los bacteriófagos.
- La eliminación de los bacteriófagos por el sistema inmunitario (anticuerpos).
- La resistencia de la bacteria hospedador a la infección por bacteriófagos.
- Los bacteriófagos líticos son ideales para la terapia, aunque la mitad de los bacteriófagos son atemperados (su DNA se integra al genoma del hospedador), lo cual deja al hospedador intacto y vivo⁽⁸⁰⁾.

Otra aplicación de los bacteriófagos son eliminar a los supergérmenes que forman biofilms, presentes sobre los dispositivos médicos implantados. El uso de fagos para el control de biofilms es viable debido a que se replican en el sitio de la infección, durante el ciclo lítico, la infección de una célula bacteriana por un solo fago, resulta en la producción de docenas o cientos de fagos, dependiendo del fago en particular y de la célula hospedadora. Se ha demostrado que el uso de un cóctel de bacteriófagos en forma de una cubierta de hidrogel sobre catéteres previene la formación de biofilms^(80,81).

Algunos fagos también han manifestado la producción de enzimas que degradan el polímero extracelular que conforma el biofilm, cuya progenie se propaga radialmente, siendo en teoría una simple dosis de fagos degradar el biofilm. Tal es el caso de los fagos PT-6, PA1Φ, este último requiere la presencia de pili tipo IV, para la infección (**Figura 31**)⁽⁸¹⁻⁸³⁾.

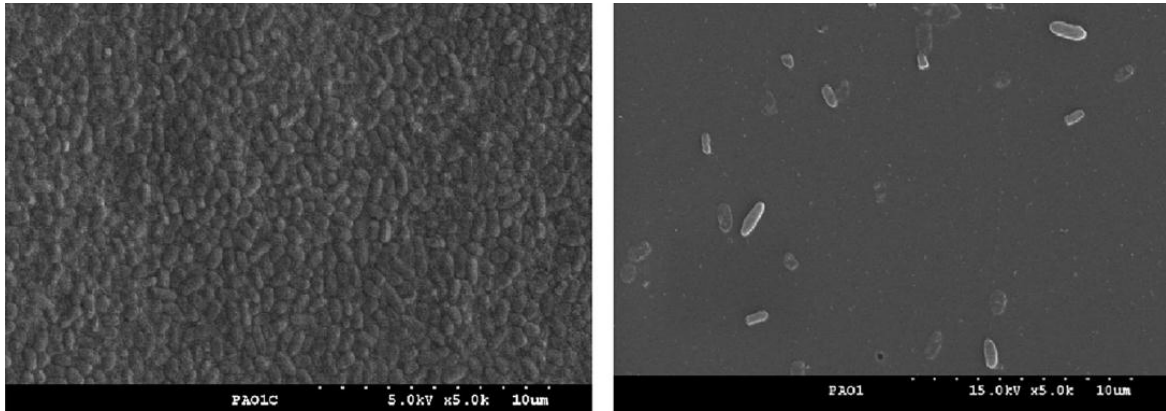


Figura 31. Tratamiento de superficie con fago PA1Φ y su capacidad para remover biofilms formados por *P. aeruginosa*⁽⁸³⁾.

De cualquier modo, los fagos no son comúnmente utilizados en la terapia de problemas severos, debido a su rango limitado de hospederos, la pureza baja, pobre estabilidad o viabilidad de las preparaciones de fagos y la falta de comprensión del modo de acción de los fagos. Sin embargo la aparición de cepas multirresistentes a fármacos (MDR, *multidrug-resistant*) ha contribuido al renacimiento y aprobación de esta opción terapéutica⁽⁸³⁾.

El uso de la fagotipia para la caracterización de ciertas cepas de *P. aeruginosa*, es bien conocido y tiene muchas aplicaciones. Sobre todo en los estudios epidemiológicos en hospitales. La importancia de esta clasificación estriba en que los diversos lisotipos son estables, este hecho permite llegar a la definición de foco, como aquellos casos producidos por el mismo lisotipo; por el contrario, cuando de un conjunto de casos se aíslan diferentes fagotipos, indica que existen diversos focos de infección. En comparación con las otras técnicas de tipificación epidemiológica, la fagotipia tiene más poder discriminatorio con respecto a la serotipia del antígeno O, al realizarse simultáneamente se observa que la fagotipia marca subdivisiones dentro de los serotipos O. La fagotipia y piocinotipia se complementan de forma que reducen el número de cepas que no se pueden tipificar^(6,84-86).

La determinación del fagotipo se efectúa en una placa de cultivo previamente cuadrículada una siembra masiva en superficie de la cepa problema y depositando en cada cuadrícula una gota de cada uno de los fagos seleccionados. Después de incubar a 37 °C por 24 hrs, se determina el fagotipo, que viene definido por el fago o los fagos que lisan la cepa problema (**Figura 32**)⁽⁶⁾.

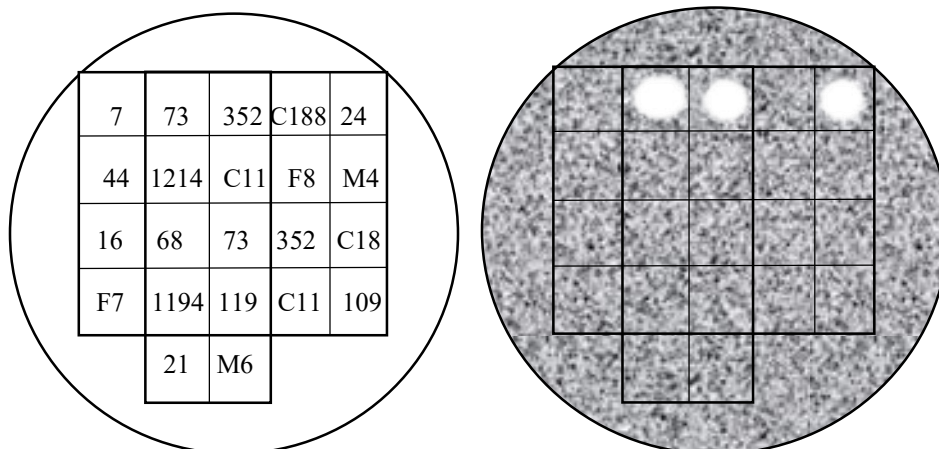


Figura 32. Determinación del fagotipo de una cepa problema de *P. aeruginosa* en agar TSA: 73/352 /C188⁽⁸⁶⁾.

5.9. Resistencia a antibióticos y desinfectantes.

P. aeruginosa presenta una resistencia intrínseca a diversos antimicrobianos (**Tabla 18**), sin embargo, también adquiere resistencia con facilidad a los agentes potencialmente activos (5,11).

Tabla 18. Mecanismos de resistencia a antibióticos⁽⁸⁷⁾.

| ANTIBIOTICOS | MECANISMO DE RESISTENCIA |
|-------------------------|--|
| β-lactámicos | β-lactamasas endógenas Adquisición de β-lactamasas Bombas de flujo Disminución de permeabilidad |
| Fluoroquinolonas | Mutaciones del sitio blanco Bombas de flujo |
| Aminoglucósidos | Enzimas modificadoras de aminoglucósidos Bombas de flujo 16S rRNA metilasas. |
| Polimixinas | Modificación de LPS |

La resistencia a antibióticos es atribuida a las características de su membrana celular que posee propiedades excepcionales de impermeabilidad, las cepas pueden transmitirse entre ellas el material genético que media la resistencia o incluso a partir de otras bacterias Gram negativas como las enterobacterias. Otro factor preocupante es la capacidad de tornarse resistente en el curso del tratamiento antibiótico. Los mismos antibióticos son capaces de inducir los mecanismos de resistencia que un aislamiento tiene latentes. Otras sustancias como el zinc, componente de una clase de catéteres urinarios, también inducen cambios moleculares que activan la resistencia a imipenem. Generalmente los mecanismos de resistencia a antibióticos puede dividirse en:

- Intrínseca: Se refiere a la resistencia consecuencia de una larga selección de mecanismos genéticamente codificados.
- Adquirida: Se refiere a la resistencia que se logra vía adquisición de mecanismo adicionales o como consecuencia de eventos mutacionales^(5,88).

5.9.1. Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de bombas de flujo.

Las bombas de flujo son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos, detergentes y sustancias anfipáticas (**Figura 33**). La expresión de estas bombas puede ser permanente (expresión constitutiva) o intermitente (expresión que puede inducirse). Antes de la era de los antibióticos *P. aeruginosa* ya poseía estos complejos enzimáticos, que se compone de una proteína ligadora en el espacio periplásmico y un canal de salida en la membrana externa. Tiene la capacidad de expulsar al exterior de la bacteria y contra un gradiente de concentración, β -lactámicos, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim. Estos sistemas de expulsión son los responsables de la impermeabilidad a la mayoría de los antibióticos (**Tabla 19**)^(26,89).

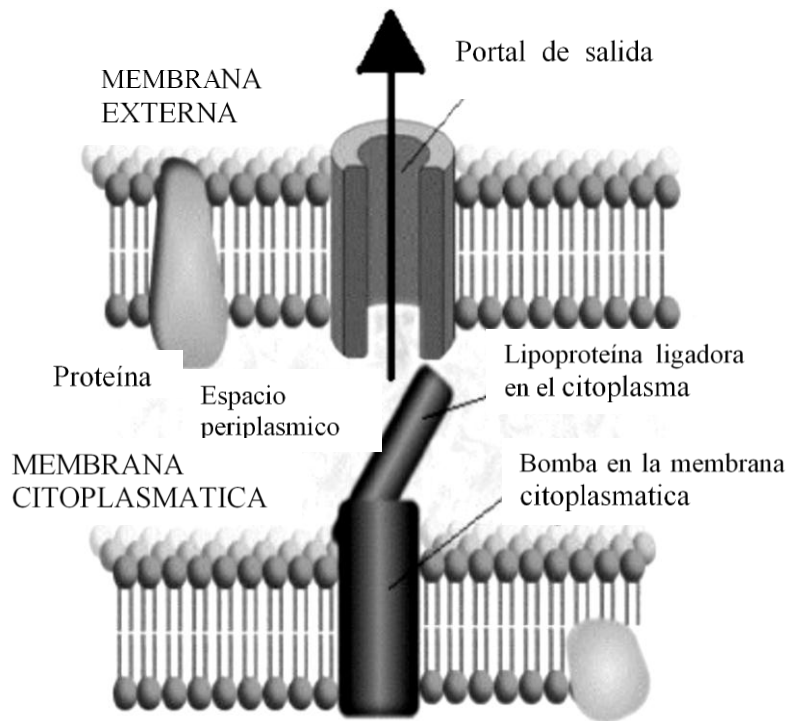


Figura 33. Esquema del mecanismo de expulsión de antibióticos MexAB-OprM. La flecha indica la vía de salida del antibiótico desde el espacio periplasmático hacia el exterior de la bacteria. Se muestran sus tres componentes: Bomba en la membrana citoplasmática, la proteína ligadora y la porina de salida en la membrana externa⁽²⁶⁾.

Tabla 19. Sistemas de flujo de *P. aeruginosa*⁽⁸⁷⁾.

| Bombas de flujo | Familia | Sustratos |
|---------------------------|---|--|
| MexAB-OprM | Resistance Nodulation División (RND) | Fluoroquinolonas Aminoglucósidos B-lactámicos (Preferentemente meropenem y ticarcilina) |
| MexCD- OprJ | Resistance Nodulation División (RND) | Fluoroquinolonas B-lactámicos (Preferentemente meropenem) Tetraciclina Tigeciclina Cloranfenicol Eritromicina Roxitromicina |
| MexEf-OprN | Resistance Nodulation División (RND) | Fluoroquinolonas B-lactámicos (Preferentemente meropenem) Tetraciclina Tigeciclina Cloranfenicol |
| MeXY-OprM | Resistance Nodulation División (RND) | Fluoroquinolonas B-lactámicos (Preferentemente meropenem) Tetraciclina Tigeciclina Cloranfenicol |
| AmrAB-OprA | Resistance Nodulation División (RND) | Aminoglucósidos |
| PmpM | Multidrug and Toxic compound extrusión (MATE) | Fluoroquinolonas |
| Mef(A) | Major Facilitator Superfamilia (MFS) | Macrólidos |
| ErmE_{PAF} | Small Multidrug Resistance (SMR) | Aminoglucósidos |

Las bombas de expulsión, tienen también la capacidad de ser inducidas por antibióticos, especialmente ciprofloxacino; además, los cambios mutacionales, incluso de una sola base nucleotídica en el ADN cromosómico de la bacteria, pueden sobre expresar estas bombas. Hasta el momento no se ha encontrado ninguna bomba de flujo capaz de expulsar al

imipenem. El sistema de flujo MexAB-OprM es capaz de transportar meropenem y su expresión exagerada conduce a la elevación de la CIM del antibiótico. La sobreexpresión de MexAB-OprM, compromete la acción de quinolonas, penicilinas, cefalosporinas e incluso meropenem pero no imipenem. La sobreexpresión de otra bomba de expulsión, MexEF-OprN, confiere resistencia a quinolonas y algunos β -lactámicos, que incluyen meropenem e imipenem. Ésta última bomba tiene una importante particularidad debido a que su expresión está estrechamente relacionada con el gen Mex T, que también está involucrado en la mutación que origina la pérdida de la porina OprD como se verá más adelante. La sobreexpresión de MexXY-OprM afecta a los β -lactámicos, las quinolonas, el meropenem y los aminoglucósidos sin afectar la acción del imipenem⁽²⁶⁾.

5.9.2. Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa.

Las porinas son canales proteicos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que participan en el transporte de moléculas hidrofílicas desde el medio externo al espacio periplasmático. Su papel primitivo es permitir la captación pasiva de aminoácidos básicos a través de la membrana externa. Se sabe además, que es capaz de permitir la entrada de carbapenémicos, aunque no de otros β -lactámicos. Los carbapenémicos llegan al espacio periplasmático pasando a través de porinas. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión. Ambos procesos dan origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas como los carbapenémicos. De esta manera, la velocidad de acumulación de los carbapenémicos en el espacio periplasmático disminuye notablemente. Normalmente, la pérdida de porinas no confiere una resistencia franca y sólo eleva los valores de la CIM (concentración mínima inhibitoria) para carbapenem sin superar los puntos de corte que determinan resistencia^(26,89).

P. aeruginosa, tiene una porina específica de sustrato, llamada OprD, es la encargada de transportar los carbapenémicos a través de la membrana externa (**Figura 34**). Su pérdida eleva considerablemente la CIM de imipenem y, en menor grado, la de meropenem⁽⁸⁹⁾.

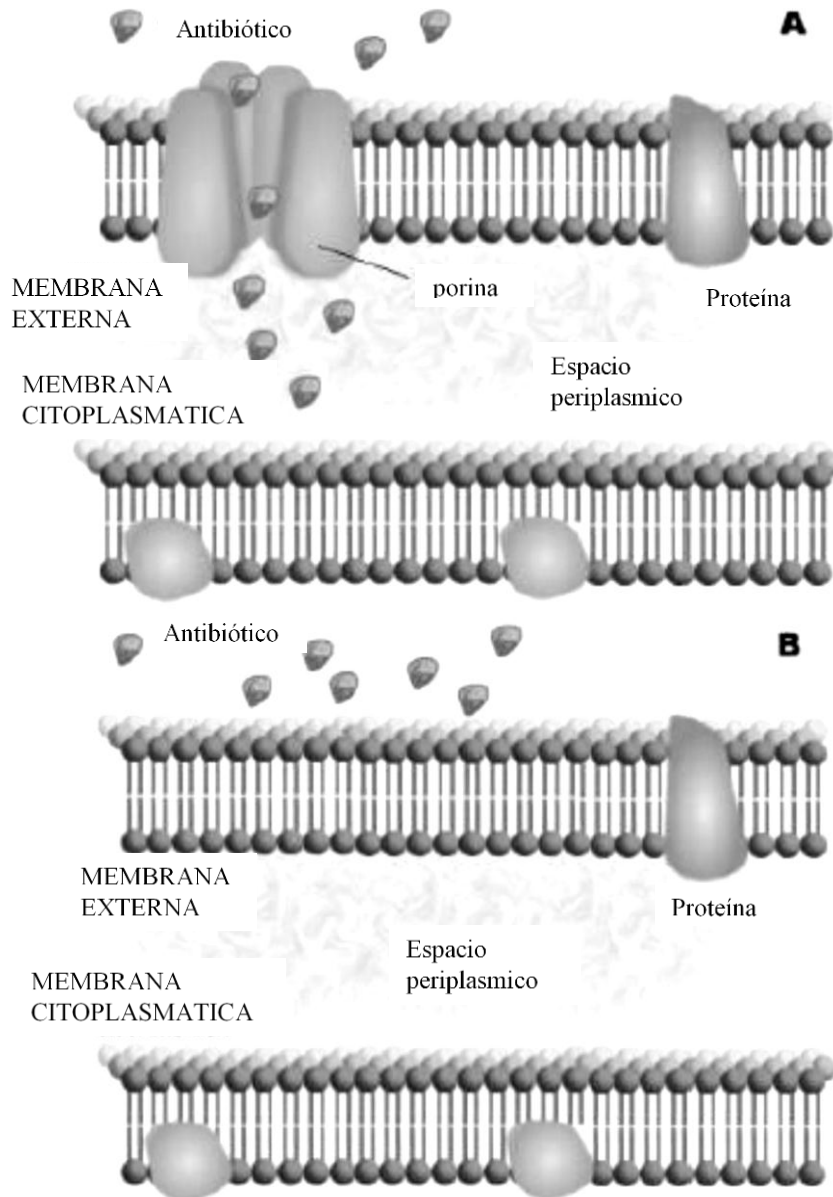


Figura 34. Esquema porina OprD en la membrana externa de *P. aeruginosa*, A: La presencia de la porina permite la libre entrada del antibiótico hacia el espacio periplasmático de la bacteria y de allí hacia su sitio de acción. B. La ausencia de esta porina en cepas mutantes, otorga una resistencia franca a imipenem y una susceptibilidad disminuida a meropenem⁽²⁶⁾.

El único antibiótico para el cual se explica claramente la resistencia por medio de una alteración del transporte de membrana es el imipenem. En algunas situaciones, este antibiótico ingresa no a través de una proteína porina principal sino a través de una proteína de transporte específica, designada D2. Sin embargo al parecer se requiere la presencia de una β -lactamasa de clase C cromosómica para la resistencia, además de la proteína alterada⁽⁷⁾.

5.9.3. β -Lactamasas.

Las β -lactamasas se han clasificado de acuerdo con su especificidad por el sustrato (penicilinasas o cefalosporinasas), la clase molecular (A, B, C, D), la susceptibilidad a inhibidores (EDTA, ácido clavulánico) y la localización genética (plasmídica o cromosómica)⁽⁸⁸⁾.

Esta enzima, es inducida en cuestión de días, por tanto, antes del tratamiento, los β -lactámicos parecen servir, pero clínicamente el paciente no mejora y se descubre posteriormente la inducción completa de la enzima. *P. aeruginosa* posee dos clases de β -lactamasas: Amp-C y las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)⁽⁵⁾.

β -Lactamasas tipo Amp-C. *P. aeruginosa* posee el gen *ampC* en su cromosoma., tiene la capacidad de ser inducida por los propios β -lactámicos, especialmente cefalotina y ampicilina. Median la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, cefemicinas (cefoxotín y cefoxetán) e inhibidores de β -lactamasas. Las β -lactamasas tipo *ampC* presentan baja afinidad a los carbapenémicos; sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria cierra porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplasmático permite que la enzima hidrolice al antibiótico y se registre resistencia a los carbapenémicos^(5,89).

Las bacterias que poseen el gen *ampC* en los cromosomas presentan un sofisticado sistema molecular que regula la expresión del gen, de tal modo que sólo se sintetiza la β -lactamasa cuando es necesaria. La expresión de AmpC en estado basal (**Figura 35**), ocurre durante el reciclaje normal de la pared celular, los 1,6-anhidromuropeptidos son removidos de la pared celular y transportados dentro del citoplasma vía AmpG permeasa. Los 1,6-anhidromuropéptidos, son escindidos por una amidasa, AmpD, para generar tripéptidos, que son convertidos en UDP-MurNAc-pentapéptidos, los cuales se unen a la región intergénica AmpR-AmpC, para crear una conformación que reprime la transcripción de *ampC*. Sin embargo se llegan a producir bajos niveles de AmpC localizados en el espacio periplásmico^(89,90).

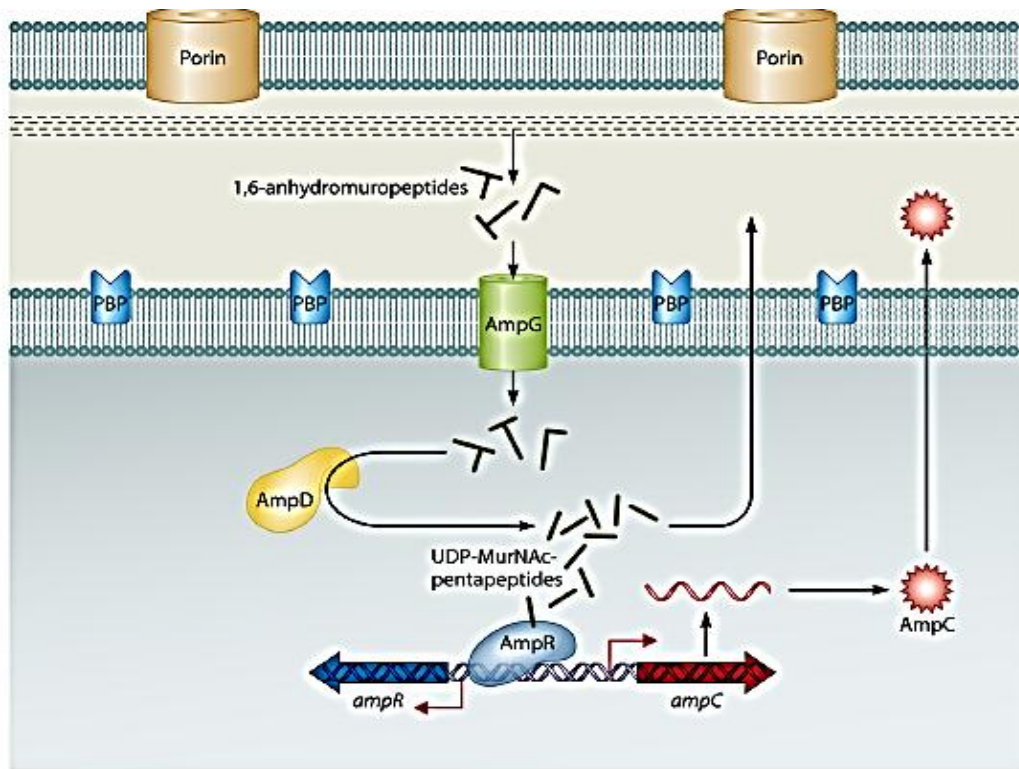


Figura 35. Expresión de AmpC en estado basal⁽⁹⁰⁾.

Los antibióticos como cefoxotín e imipenem cruzan la membrana celular a través de porinas, entran en el espacio periplásmico, e interactúan con el sitio blanco, PBP. Se observa un incremento de 1,6-anhidromuropeptidos, y AmpD es incapaz de los altos niveles de fragmentos de la pared celular. Los anhidro-MurNac-péptidos (péptidos inductores) reemplazan a los UDP-MurNac pentapéptidos (péptidos supresores) la unión con AmpR causa un cambio conformacional en la proteína. AmpR es convertida en un activador transcripcional, ampC es expresado en altos niveles y los niveles de AmpC aumentan en el espacio periplásmico. Cuando las concentraciones de β -lactámicos disminuyen debajo de los niveles de inducción, la reserva citoplasmática de péptidos anhidro-MurNac también disminuye y AmpD es capaz de escindir estos péptidos restaurando el estado basal de expresión de ampC (**Figura 36**)⁽⁹⁰⁾.

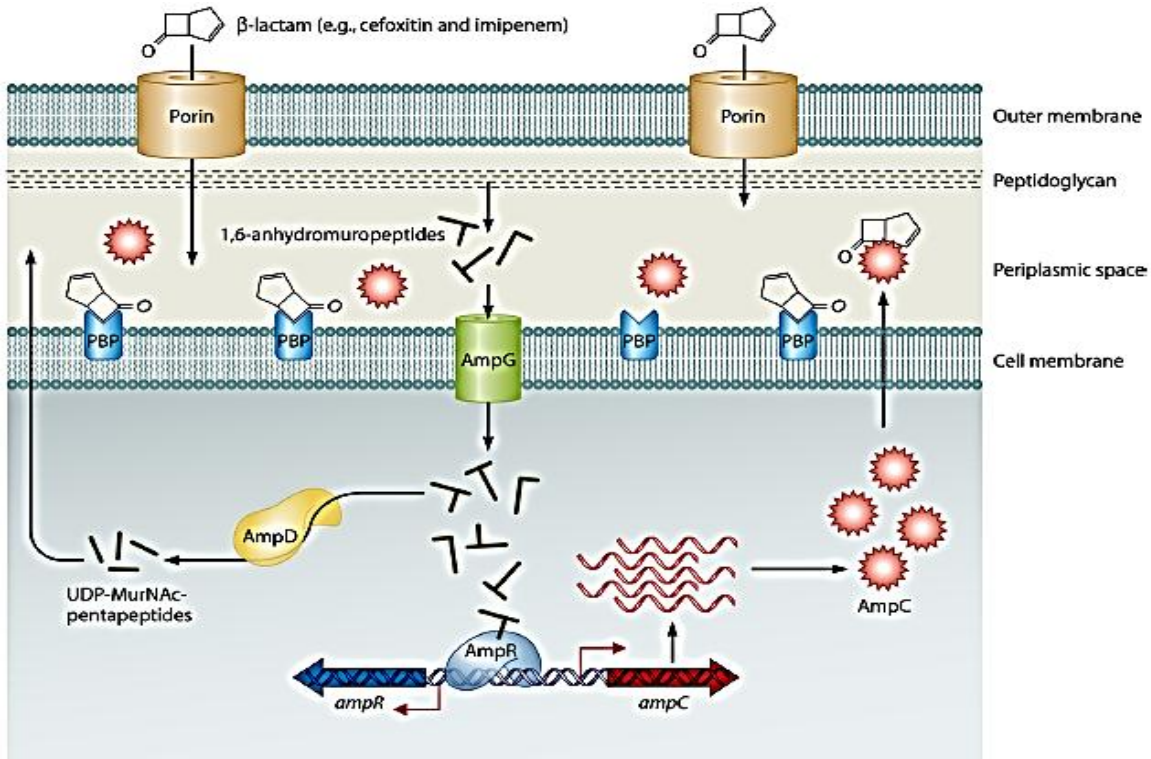


Figura 36. Inducción de AmpC por β -lactámicos en *P. aeruginosa*.⁽⁹⁰⁾.

β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Se han descrito dos tipos de carbapenemasas con base en estudios moleculares. Las primeras son enzimas que poseen un residuo de serina en su sitio activo, razón por la cual se han denominado carbapenemasas tipo serina. El segundo grupo son enzimas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática; éstas últimas son las denominadas metalo- β -lactamasas (MBL).

Es común pensar que la producción de una carbapenemasa es suficiente para que la bacteria presente resistencia a los carbapenémicos. Sin embargo, en Enterobacterias se ha demostrado que, además de la carbapenemasa, se requiere de la disminución de la permeabilidad de la membrana externa mediante la pérdida de porinas⁽⁸⁹⁾.

Carbapenemasas de Clase A. Comprenden cinco grupos: SME, IMI, NMC, KPC y GES/IBC (Tabla 20). En general, hidrolizan todos los lactámicos, aunque la eficacia catalítica o de hidrólisis sobre las cefalosporinas de tercera y cuarta generación es bastante modesta⁽⁹¹⁾.

Tabla 20. Carbapenemasas aisladas en cepas de *P. aeruginosa*⁽⁹¹⁾.

| Clase | Carbapenemasa | Variante | Año de la primera detección | Países en que se ha detectado | Localización |
|----------|---------------|-----------------------------------|-----------------------------|--|---|
| A | KPC | 2 | 2006 | Colombia | Plasmídica (no en integrones) |
| | | 5 | 2006 | Puerto Rico | |
| | GES | 2 | 2000 | Sudáfrica | Plasmídica en integrones de clase 1 |
| | | 5 | 2004 | China, Brasil, España, | |
| B | IMP | 1, 2, 4, 6 a 16, 18 a 22, 25 y 26 | 1991 | Mundial, principalmente extremo Oriente-Pacífico | Plasmídica en integrones de clases 1 y 3 (menos frecuentes) |
| | VIM | 1 a 11, 13 a 18, y 20 | 1997 | Mundial, principalmente Europa. | Plasmídica en integrones de clase 1 (también cromosómica) |
| | SPM | 1 | 1997 | Brasil, Suiza | Plasmídica (no en integrones) |
| | GIM | 1 | 2002 | Alemania | Plasmídica en integrón de clase 1 |
| | AIM | 1 | 2007 | Australia | No hay datos disponibles |
| D | OXA | 40 | 2008 | España | Plasmídica (no en integrones) |
| | | 50a a 50d (PoxB) | 2004 | Francia | Cromosómica |

Las carbapenemasas tipo KPC se describieron por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* (de ahí sus iniciales). En *P. aeruginosa* han sido detectadas en sólo dos variantes: KPC-2 en una cepa clínica en Colombia, y KPC-5, en Puerto Rico, que de hecho se ha descrito únicamente en *P. aeruginosa*. Las carbapenemasas KPC son plasmídicas, aunque sus genes no están en forma de casetes en integrones, sí están asociados a elementos móviles como secuencias de inserción o transposasas. Su espectro de hidrólisis incluye todos los betalactámicos, si bien la eficacia de hidrólisis sobre los carbapenémicos y las monobactámicos es hasta 10 veces menor que sobre las penicilinas y las cefalosporinas.

Las carbapenemasas tipo GES/IBC se describieron por primera vez, casi en paralelo, en dos variantes: GES-1 (siglas procedentes de Guiana extended spectrum, por su país de origen) en una cepa de *K. pneumoniae*, e IBC-1 (del inglés *integrón borne cephalosporinase*) en un aislado de *Enteobacter cloacae* en Grecia, ambas en el año 2000. Difieren en sólo un aminoácido, y fueron definidas como BLEE. En *P. aeruginosa* se han detectado sólo las variantes GES-2 y GES-5, siempre de codificación plasmídica en el seno de integrones. Las GES con actividad carbapenemasa parecen tener una actividad modesta sobre los monobactámicos.

Carbapenemasas de clase B. Las carbapenemasas de clase B conocidas como MBL, son quizá el grupo más relevante de carbapenemasas, tanto por diversificación en diferentes variantes aminoacídicas como por su diseminación prácticamente mundial, y en diferentes microorganismos. Como elemento definitorio, las MBL poseen un motivo de unión de zinc del tipo His-X-His-X-Asp, al que se unen dos iones de zinc, necesarios para la actividad de la enzima. Así pues, todas las MBL tienen también en común su inhibición por quelantes metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Dentro de ellas, se distinguen ocho grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM. Las MBL AIM-1 y DIM-1 se han detectado recientemente en *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*, en Australia y Holanda, respectivamente, pero la información disponible acerca de ellas es aún muy escasa.

Las IMP (Imipenemase) se detectaron por vez primera en 1991 en Japón, en *S. marcescens*. Hasta hoy se han descrito variantes aminoacídicas hasta la IMP-26. Los genes de las IMP se hallan en forma de casetes en integrones plasmídicos, principalmente de clase 1, aunque también se han detectado en clase. Las IMP, en general, parecen tener una menor eficiencia en la hidrólisis que las VIM.

Las VIM se detectaron por vez primera en *P. aeruginosa* en Verona, en 1997, de ahí sus siglas: *Veronese IMipenemasa*. Si bien se han hallado casos de codificación cromosómica de los genes de VIM, lo más habitual es la presencia de estos genes en forma de casetes en integrones de clase 1. Respecto al espectro de hidrólisis, VIM-1 parece hidrolizar mejor a prácticamente todos los betalactámicos (sobre todo, a ciertas cefalosporinas) que VIM-2, lo

cual parece explicarse por cambios de aminoácidos cercanos o en el propio centro activo de la enzima.

Los grupos SPM, GIM y SIM, cuentan con un solo representante cada uno. La identificación de SPM-1 (Sao Paulo metallo- β -lactamase) se realizó en un aislado clínico de *P. aeruginosa* en 2001. Esta MBL presentó localización plasmídica, aunque no relacionada con integrones o elementos móviles.. GIM-1 se detectó en Alemania (German IMipenemasa), en diferentes aislados clínicos. Se demostró su presencia en un integrón de clase 1 situado en un plásmido no transferible de 22 Kb. En cuanto a sus características de hidrólisis de betalactámicos, GIM-1 mostró una menor actividad, en general, que el resto de MBL clínicamente relevantes.

Carbapenemasas de clase D. Las betalactamasas tipo OXA se detectan habitualmente como casetes en integrones situados en plásmidos o transposones, aunque también, en ciertos casos, asociadas a secuencias de inserción. Las primeras OXA, descritas en la década de 1980, inicialmente se caracterizaron por hidrolizar cloxacilina y oxacilina (de ahí su nombre), pero sin afectar significativamente a los carbapenémicos ni a las cefalosporinas de espectro extendido. Hasta la fecha se han descrito más de 100 variantes aminoacídicas de OXA. No obstante, sólo determinadas variantes de OXA-2 y OXA-10 afectan a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y también a los monobactámicos. En *P. aeruginosa*, se ha detectado la única carbapenemasa transferible de clase D, OXA-40. Las betalactamasas PoxB (OXA-50a a -50d) fueron caracterizadas como oxacilinasas cromosómicas presentes de forma natural en el cromosoma, pero que, en condiciones normales, no parecen expresarse. En ausencia de expresión de ampC, la expresión de poxB se ve aumentada. La acción de las carbapenemasas tipo OXA sobre los carbapenémicos es bastante modesta (mayor eficacia hidrolítica sobre el imipenem que sobre el meropenem), aunque siempre superior al efecto sobre las cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos, prácticamente nula. El nivel de inhibición que provocan los clásicos inhibidores de betalactamasas (clavulanato, tazobactam) sobre las OXA es variable, aunque en general bastante débil, al contrario de lo que ocurre con el NaCl, que se muestra como un fuerte inhibidor de su actividad⁽⁹¹⁾.

5.9.4. *Enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMES).*

La modificación y subsecuente inactivación de los aminoglucósidos ocurre por tres diferentes mecanismos (**Tabla 21**):

- Acetilación por aminoglucósido acetiltransferasas (AACs) en posiciones 3 o 6'.
- Adenilación por aminoglucósido nucleotidiltransferasas (ANTs). Estas enzimas están presentes en aislamientos resistentes a gentamicina y tobramicina pero no amikacina.
- Fosforilación por aminoglucósido fosforiltransferasas (APHs). La mayoría de APH actúan en posición 3 del aminoglucósido. Inactivan fármacos que no son usados rutinariamente como kanamicina y neomicina⁽⁹³⁾.

Tabla 21. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos presentes en *P. aeruginosa*⁽⁸⁷⁾.

| Categoría | Familia enzimática | Subfamilia | Sustratos |
|--------------------------------------|---------------------------|-------------------|----------------------------|
| Acetiltransferasas (AAC) | AAC (3') | I | Gentamicina |
| | | II | Gentamicina Tobramicina |
| | | III | Gentamicina Tobramicina |
| | | IV | Gentamicina |
| | | VI | Gentamicina Tobramicina |
| | AAC (6') | I | Tobramicina Amikacina |
| | | II | Tobramicina Gentamicina |
| Nucleotidiltransferasas (ANT) | ANT (2') | I | Gentamicina Tobramicina |
| | ANT (4') | IIa | Tobramicina Amikacina |
| | | IIb | Tobramicina Amikacina |
| | ANT (3') | - | Estreptomina |
| Fosforiltransferasas (APH) | APH (3') | II | Kanamicina Neomicina |
| | | IIb | Kanamicina |
| | | IIb-like | Amikacina |
| | | VI | Amikacina Isepamicina |
| | APH (2') | | Gentamicina Tobramicina |

5.9.5. Mutaciones en el sitio blanco.

16S rRNA metilasa. La metilación del 16S rRNA en el sitio A de la subunidad 30S interfiere con la unión de los aminoglucósidos y en consecuencia promueve la resistencia a todos los aminoglucósidos. Diferentes 16S rRNA metilasas han sido descritas: RmtA, RmtB, ArmA y RmtD.

DNA girasa y topoisomerasa IV. El sitio blanco de las fluoroquinolonas son DNA girasa (GyrA y GyrB) y topoisomerasas IV (ParC y ParE). Las enzimas girasa y topoisomerasa son están compuestas por dos subunidades cada una. En consecuencia, las mutaciones en estas

enzimas repercuten en su consecuente resistencia, son más comunes en girA y/o girC más que en las otras subunidades⁽⁸⁷⁾.

Modificación de lipopolisacárido. Las Polimixinas (Polimixina B, Colistina) se unen al lipopolisacárido (LPS), el mayor constituyente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, algunos de los mecanismos de resistencia involucran modificaciones de este componente, como la modificación del Lípido A por 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa, en adición con la formación de biofilms y expresión de proteínas de membrana OprH⁽¹⁴³⁾.

5.9.6. Resistencia a desinfectantes.

En la práctica médico-quirúrgica, en el trabajo del laboratorio e incluso en la vida diaria, es importante la aplicación de procedimientos, técnicas y productos que inhiban el crecimiento o destruyan a los microorganismos patógenos, los mecanismos de acción de los antisépticos o desinfectantes son muy variados (**Tabla 22**)⁽⁶⁾.

Tabla 22. Mecanismos de acción de antisépticos y desinfectantes⁽⁹⁴⁾.

| Sitio blanco | Antiséptico o desinfectante | Mecanismo de acción |
|--|--|--|
| Envoltura celular (pared celular, membrana externa) | Glutaraldehído EDTA, otros permeabilizantes | Unión cruzada a proteínas Bacterias Gram negativa: Remoción de Mg ²⁺ , liberación de LPS |
| Membrana interna Citoplasmática | CAC | Daño generalizado de la membrana que comprometen fosfolípidos de las dos membranas |
| | Clorhexidina | Las bajas concentraciones afectan la integridad de la membrana, las altas concentraciones causan congelamiento del citoplasma. |
| | Diaminas | Inducción a la pérdida de aminoácidos. |
| | PHMB (mezcla heterodispersa de bioguanidas de polihexametileno), alexidina | Fase de separación y formación de dominios de lípidos de membrana. |
| | Fenoles | Pérdida, desacople. |
| Unión cruzada a macromoléculas | Formaldehído Glutaraldehído | Unión cruzada de proteínas, ARN y ADN. Unión cruzada de proteínas de la envoltura celular y entre otros sitios celulares. |
| Intercalación con el ADN | Acridinas | Intercalación de una molécula de acridina entre dos capas de pares de bases en el ADN. |
| Interacción con grupos tiol | Compuestos con plata | Enzimas que se unen a membrana , interacción con grupos tiol. |
| Efectos en el ADN | Halógenos Peróxido de hidrogeno, iones de plata | Inhibición de la síntesis del ADN. Ruptura de la hebra de ADN. |
| Agentes oxidantes | Halógenos Peróxidos | Oxidación de los grupos tioles a disulfuros, sulfóxidos o disulfóxidos. Peróxido de hidrógenos: Actividad debida a la formación de radicales libres OH ⁻ , que oxida a los grupos tioles en enzimas y proteínas y enzimas. |

Al igual que en la resistencia a los antibióticos, las bacterias pueden adaptarse frente a un compuesto químico. La resistencia a desinfectantes puede ser una propiedad natural de un organismo (intrínseca) o conseguida por mutación o adquisición de plásmidos (autorreplicación, ADN extracromosómico) o transposones (cromosomal o integrado en plásmidos, casetes de ADN transmisibles)^(6,94).

Resistencia intrínseca a desinfectantes en bacterias Gram negativas. Por lo general son más resistentes a los antisépticos y desinfectantes que las Gram positivas. *P. aeruginosa* es más resistente a la mayoría de estos agentes, incluyendo la clorhexidina. La membrana externa actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos sin relación química. Las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular pasan fácilmente a través de las porinas, en cambio las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de la bicapa de la membrana. Además de las vías antes descritas se ha propuesto una tercera vía para agentes catiónicos como los CAC (Compuestos Cuaternarios de Amonio), biguanidas y diamidinas, los cuales dañan la membrana y facilitan su autocaptación. *P. aeruginosa* presenta resistencia mediada por la membrana externa debida a las diferencias en la composición del lipopolisacárido (LPS) y el contenido de cationes como el magnesio, que produce enlaces estables entre moléculas de LPS y como complemento a este mecanismo, esta bacteria presenta porinas pequeñas que impiden el paso por difusión de ciertas sustancias. Algunas cepas que son muy resistentes a clorhexidina, CAC, EDTA y diamidinas se han aislado de muestras clínicas. La presencia de un LPS menos ácido en la membrana externa puede ser un factor que contribuye a la resistencia intrínseca.

Mecanismos de resistencia adquirida a desinfectantes. La resistencia adquirida a los antisépticos y desinfectantes surge por mutación o por la adquisición de material genético en forma de plásmidos o transposones; estas configuraciones permiten grandes arreglos de genes de resistencia para la mayoría de los antibióticos y desinfectantes al ser transferidos juntos en un solo evento de conjugación.

Se han reportado estudios en los que se observó que el plásmido RP1 no alteraba en forma significativa la resistencia de *P. aeruginosa* a CAC, clorhexidina, yodo o fenoles clorados, aunque se observó un aumento en la resistencia a hexaclorofeno. La transformación de este plásmido (que codifica resistencia a carbenicilina, tetraciclina, neomicina y kanamicina) en *E. coli* o *P. aeruginosa*, no aumentó la sensibilidad de estas bacterias a los antisépticos y desinfectantes.

Los mecanismos de resistencia bacteriana a formaldehído y a bactericidas industriales pueden ser codificados por plásmidos. Las alteraciones en las proteínas de la membrana externa y la formaldehído-deshidrogenasa se consideran responsables. También se ha

documentado la participación de las bombas de flujo en la adquisición de esta resistencia. La activación de estas bombas es mediada por plásmidos y es un importante mecanismo de resistencia a antibióticos, metales, desinfectantes y antisépticos catiónicos⁽⁹⁴⁾.

5.9.7. Tratamiento antipseudomonas.

Debido a la resistencia intrínseca a muchos antimicrobianos, solo algunos antibióticos son activos en infecciones contra este microorganismo. Los antibióticos más usados son: β -lactámicos, Quinolonas y aminoglucósidos (**Tabla 23**)⁽⁸⁷⁾.

β -lactámicos. Los β -Lactámicos se unen e inactivan las proteínas de unión a penicilina (PBPs) estas transpeptidasas están involucradas en la síntesis de la pared celular de las bacterias. El grupo de antibióticos β -lactámicos incluye penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos.

Quinolonas. Las quinolonas son antimicrobianos sintéticos que bloquean la replicación del ADN por inhibición de la actividad de la DNA girasa y la topoisomerasa IV.

Aminoglucósidos. Los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas por unión a la subunidad 30S o 50s ribosomal. Los antibióticos de esta clase están asociados a ototoxicidad y nefrotoxicidad, a causa de eso y su estrecho rango terapéutico, los aminoglucósidos son usados en combinación con antibióticos de otras clases. Estos agentes bactericidas exhiben sinergia con otros antimicrobianos, sobre todo con los β -lactámicos. El único tratamiento en el cual está recomendada la monoterapia es en infecciones del tracto urinario por *P. aeruginosa*^(88,92).

Tabla 23. Antibióticos anti-pseudomónicos comúnmente usados⁽⁸⁸⁾.

| Clase de antibiótico | Mecanismo de acción | Fármacos |
|---|---|--|
| Penicilinas | Inhibición de la síntesis de pared celular. | Ticarcilina |
| Penicilina/Inhibidor de Beta-lactamasa | Inhibición de la síntesis de pared celular. | Ticarcilina/ácido clavulánico Piperacilina/Tazobactam |
| Cefalosporinas | Inhibición de la síntesis de pared celular. | Ceftazidima Cefepime |
| Monobactámicos | Inhibición de la síntesis de pared celular. | Aztreonam |
| Carbapenémicos | Inhibición de la síntesis de pared celular. | Imipenem Meropenem Doripenem |
| Fluoroquinolonas | Bloquea la síntesis de ADN | Ciprofloxacino Levofloxacino Ofloxacino |
| Aminoglucósidos | Inhibición de síntesis de proteínas | Gentamicina Tobramicina Amikacina |

Existen diferencias en la susceptibilidad a antibióticos entre cepas mucoides y no mucoides. Las cepas no mucoides muestra más resistencia a antibióticos, esto puede ser por la tendencia de algunos antibióticos a atacar el glicocalix extracelular de las cepas mucoides⁽⁹⁴⁾.

5.9.8. Opciones terapéuticas para *P. aeruginosa* multirresistentes (MDR).

En realidad el único tratamiento efectivo para MDR *P. aeruginosa* es el uso de polimixinas. El sitio de acción de la colistina es la membrana celular de la bacteria, interactúa con el lípido A de los lipopolisacáridos, permitiendo la penetración a través de la membrana externa por desplazamiento de Ca^{2+} y Mg^{2+} . La inserción entre los fosfolípidos conduce a la pérdida de la integridad de la membrana y como consecuencia a la muerte de la célula bacteriana. Existen reportes de resistencia a polimixina B y colistina en aislamientos clínicos pero son relativamente raros. El mecanismo de resistencia a polimixina en casos clínicos es desconocido, la sustitución del lípido A por aminoarabinosa contribuye a la resistencia a polimixina in vitro y en aislamientos de fibrosis quística. La colistina es asociada a nefro y neurotoxicidad pero ambos efectos adversos dependen de la dosis y son reversibles.

Otra interesante opción terapéutica para MDR *P. aeruginosa* es fosfomicina, un viejo antibacteriano, que está llamando la atención por sus resultados *in vitro* contra varios aislamientos. La fosfomicina inactiva la enzima piruvil-transferasa, requerida para la síntesis del péptidoglicano de la pared celular. La fosfomicina puede ser administrada también con aminoglucósidos, cefalosporinas y penicilinas, aunque se necesitan más estudios para determinar el futuro rol de la fosfomicina en la terapia.

Algunos estudios han demostrado *in vitro* la eficacia de combinaciones de antibióticos contra MDR *P. aeruginosa* :

- Ticarcilina/Tobramicina/Rifampicina
- Cefalosporinas/Quinolonas
- Ceftazidima/ Colistina
- Macrólidos/Tobramicina/Trimetoprim/Rifampicina
- Polimixina B/Rifampicina
- Polimixina B/Imipenem
- Colistina/Meropenem⁽⁸⁸⁾.

5.9.9. Prueba de susceptibilidad a antibióticos.

Las infecciones son difíciles de tratar por el incremento de resistencia a antibióticos. Para seleccionar el antibiótico correcto se requiere determinar la susceptibilidad a antibióticos(**Tabla 24**) enviando una muestra del paciente al laboratorio que será procesada por cualquiera de las técnicas de antibiograma (Kirby-Bauer, microdilución en caldo, sistemas automatizados, E-test)^(95,96).

Tabla 24. Antibióticos utilizados en antibiograma para *P. aeruginosa*⁽⁹⁶⁾.

| Antibiótico | Observaciones |
|--------------------------------|---|
| Gentamicina | ---- |
| Amikacina | ---- |
| Ceftazidima(CAZ) | En montajes manuales se puede ubicar CAZ junto a imipenem a 2 cm y a 2.7 de CAZ/CLAV para detectar BLEEs |
| Cefepime | ---- |
| Piperacilina-Tazobactam | ---- |
| Meropenem(MER) | La resistencia a carbapenémicos en no fermentadores es cada vez más común y en general los aislamientos que la presentan, suelen ser multirresistentes. Es importante resaltar la importancia de evaluar la actividad de los dos (IMI y MER) en todos los aislamientos, ya que no siempre la resistencia es cruzada, si solo se evalúa la actividad de uno, no se puede extrapolar al otro. Al detectar la resistencia es útil aplicar las técnicas con EDTA y APB para detectar el tipo de carbapenemasa presente. |
| Imipenem(IMI) | |
| Ciprofloxacino (CIP) | ---- |
| Aztreonam (ATM) | ---- |
| Colistina | En infecciones con cepas multirresistentes o cepas que muestren resistencia o susceptibilidad intermedia por disco, y que el médico quiera usarla como tratamiento, se debe evaluar la actividad a estos antibioticos. |

Adicional a probar estos antibióticos, se puede hacer pruebas para la búsqueda de enzimas responsables de mecanismos de resistencia tales como: Prueba para la detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), prueba con EDTA para la detección de carbapemenasas tipo Metallo- β -lactamasas (MBL) y con prueba de Ácido fenil Borónico (APB) para la detección de serin-carbapenemasas tipo 2 f (KCP).

Para el caso de la prueba de BLEE, es importante realizar la búsqueda de este tipo de enzimas en estos microorganismos; así mismo para la prueba de búsqueda de KPC es importante resaltar que si bien KPC se caracteriza por la inhibición con ácido fenil borónico (APB), los altos niveles basales de cefalosporinasa cromosómica (enzima tipo AmpC) condicionan los resultados de las pruebas de sinergia entre carbapenémicos y discos de APB. Tanto la cloxacilina como la oxacilina son inhibidores específicos de AmpC y no de KPC, lo que permite superar la baja especificidad del ácido borónico para detectar KPCs en cepas con altos niveles de AmpC. Por lo cual para el caso de *P. aeruginosa* se recomienda usar adicional al

disco de APB un disco de cloxacilina u oxacilina. Aquellas cepas donde el mecanismo implicado en la resistencia a carbapenémicos fuera enzimas AmpC, cursarán con una doble inhibición (APB y CLOXA/OXA). Aquellas cepas donde el mecanismo implicado en la resistencia a carbapenémicos fuera enzimas KPCs, inclusive cuando esté presente con una especie bacteriana con hiperproducción de AmpC mostrarán sólo inhibición por APB y no por CLOXA/OXA⁽⁹⁶⁾.

5.10. Sistema sensor del quorum.

La densidad celular altera la expresión génica de las células bacterianas en un proceso conocido como detección de quorum (quorum sensing) que se refiere a la capacidad de las bacterias para comunicarse y coordinar el comportamiento⁽⁹⁷⁾.

El Quórum sensing (QS) básicamente es un sistema de señalización bacteriana, relacionado con la producción de una molécula-señal, el autoinductor, el cual es una-homoserín Lactona sintetizada por una sintetasa codificada por genes que pertenecen a la familia *luxI*⁽²⁶⁾.

En la síntesis de Homoserín-Lactona en bacterias Gram-negativas. El grupo hexanoil es transferido por ACP (Acil Proteína Acarreadora) a una cisteína en LuxI homologa para activarla; y SAM (S-adenosimetionina) para activar este sitio. El grupo hexanoil es liberado por la cisteína para formar una amida unida al amino de SAM. 5', metiltioadenosina es liberada y una reacción de lactonización resulta en la síntesis de hexanoil serin lactona (Figura 37)⁽⁹⁸⁾.

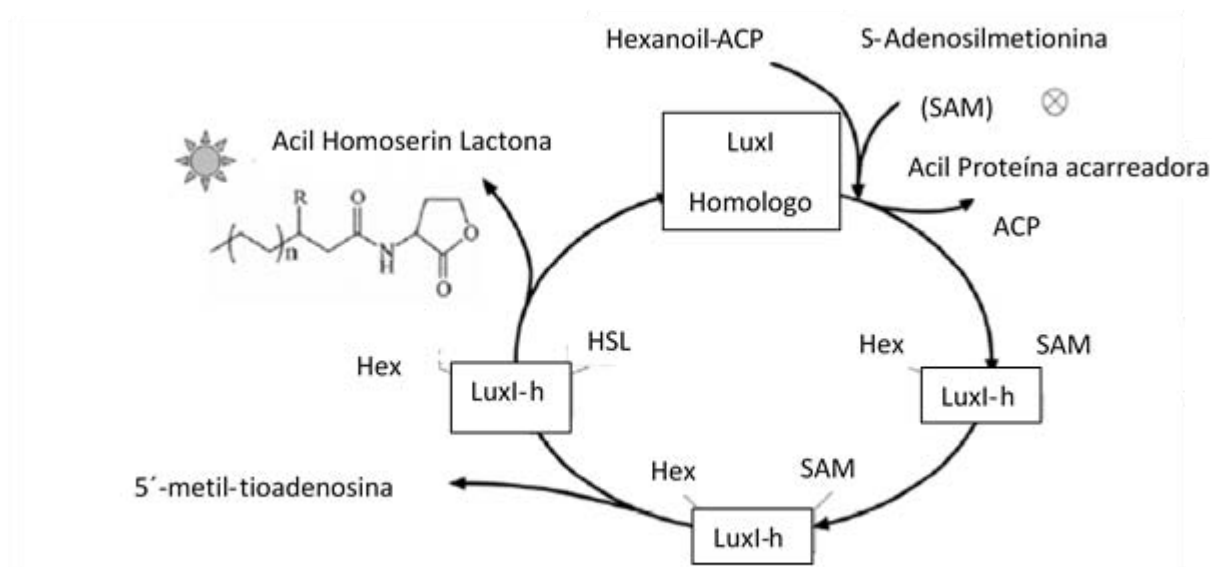


Figura 37. Esquema de la síntesis de Homoserín-Lactona en bacterias Gram-negativas⁽⁹⁸⁾.

Una vez sintetizado el autoinductor es exportado al exterior celular. Cuando la población bacteriana aumenta concomitantemente lo hace la concentración del autoinductor, el cual al rebasar un umbral de concentraciones transportado al interior de las bacterias donde forma

un complejo con el regulador transcripcional *LuxR*. Una vez formado el complejo *LuxR*-autoinductor, este estimula la transcripción del gen *LuxR* generando así un círculo de retroalimentación positiva. El complejo *LuxR*-Autoinductor controla simultáneamente la transcripción de otros genes cuya activación responde al aumento de la densidad celular⁽²⁶⁾.

Las bases de la patogenicidad radica en su capacidad para producir y secretar factores de virulencia como proteasas, hemolisinas, exotoxina A, exoenzima S y piocianina. Estos exofactores en conjunto son capaces de causar daño extenso en tejidos humanos y de otros mamíferos. QS no solo controla la producción de los factores de virulencia si no también la formación de biofilms contribuyendo significativamente a la patogénesis y persistencia de la infección. El sistema quorum sensing comprende dos sistemas jerarquizados cada uno consiste en un autoinductor sintetasa (*LasI/RhlI*) y una correspondiente proteína reguladora (*LasR/RhlR*)⁽⁹⁸⁾.

El sistema de señalización del tipo QS *LasI/LasR*. *LasI* es una sintetasa que genera la homoserin lactona 3-oxo-C₁₂-HSL (N-[3-oxododecanoil]-L-homoserin lactona). En tanto *LasR* actúa como regulador transcripcional. Este sistema fue llamado de esta forma ya que controla la expresión de la proteasa *LasR*. Además de controlar la expresión de *LasB*, este sistema de señalización controla la producción de proteasa A y de la exotoxina A.

P. aeruginosa tiene un segundo sistema de señalización de QS llamado *Rhl* por su capacidad de controlar la síntesis de ramnolípido. Este sistema está compuesto por *RhlI*, la sintetasa del autoinductor C₄-HSL(N-butilril-L-homoserina lactona), y por el factor transcripcional *RhlR*. Este sistema regula la expresión del operón *rhlAB* que codifica para la ramnosiltransferasa requerida para la síntesis de ramnolipidos. EL sistema *Rhl* es también necesario para la producción óptima de la elastasa *LasB*, la proteasa *LasA*, piocianina, HCN y proteasa alcalina. De manera interesante, el sistema *Rhl* controla la expresión de *rpoS*, el gen que codifica para el factor sigma S, el cual está íntimamente relacionado con la respuesta al estrés generado en fase estacionaria.

Los diferentes sistemas de QS presentan una organización jerárquica de regulación, el complejo *LasR*-3oxo-C₁₂-HLS controla transcripcionalmente a *RhlR* y *RhlI*. La expresión de *RhlR* a su vez, está regulada por sí mismo, tanto positiva como negativamente. *RhlR* se encuentra en forma de dímero en ausencia de la homoserin lactona. El dímero se una a la

región reguladora de RhIR reprimiendo su expresión. En presencia del autoinductor el dímero se disocia y entonces activa la transcripción de RhIR⁽²⁶⁾.

El nivel de complejidad de la señalización por QS en *P. aeruginosa* aumenta por la presencia de un tercer sistema de comunicación denominado PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) donde el autoinductor es una quinolona (2-heptil-3hidroxi-4-quinolona), cuya señal controla la expresión de lasB, la cual codifica para el mayor factor de virulencia, Elastasa. En el sistema pqs los productos de pqsABCD y pqsH están involucrados en la síntesis del autoinductor PQS y otra clase de alquil quinolonas. El sistema PQS establece de nueva cuenta la relación entre el sistema Rhl y Las. Tanto el sistema Rhl como el sistema Las controlan la síntesis de la PQS. A su vez, la PQS controla la expresión de RhIR y RhII. La transcripción de los genes requeridos para sintetizar la PQS controla expresión de estos genes(**Figura 38**)^(99,100).

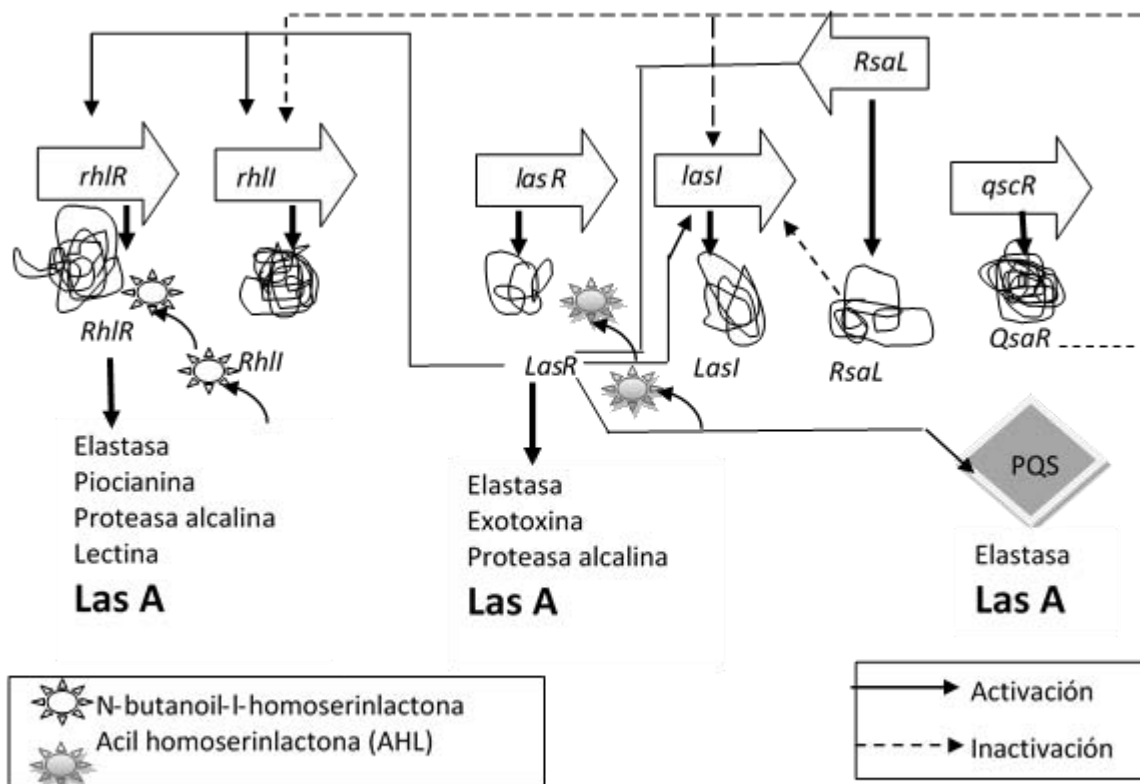


Figura 38. Integración de los sistemas sensing quorum Las y Rhl de *P. aeruginosa* con otros reguladores globales para la producción de múltiples factores de virulencia⁽⁹⁸⁾.

El sistema de QS contribuye a su patogenicidad no solamente regulando la expresión de los factores de virulencia, sino también induciendo procesos inflamatorios. La inyección intradérmica de 3-oxo-C₁₂-HLS en ratones estimula citosinas inflamatorias y metabolitos de ácido araquidónico. El 3-oxo-C₁₂-HLS ejerce numerosas actividades inmunomodulatorias sobre linfocitos, macrófagos y producción de anticuerpos., tiene influencia entre el balance de células Th1 t y Th2 y promueve en gran medida la producción de interleucina 8⁽²⁶⁾.

El sistema de detección de quorum ofrece amplias ventajas a *P. aeruginosa* en el control de la virulencia, en primer lugar, es económico producir factores extracelulares solo después de alcanzar una población crítica. Se requiere una masa crítica para producir suficientes factores para influir en el medio ambiente circundante. Además el momento de la liberación de factores de virulencia puede ser crítico. El patógeno puede acumular sus factores y después montar un ataque sorpresa en el que el arsenal de factores de virulencia se despliega de manera coordinada y contundente, en tales concentraciones que permiten sobrepasar las defensas del hospedero, permitiendo la invasión de vasos sanguíneos, diseminación, el síndrome sistémico de respuesta inflamatoria, y algunas veces la muerte^(26, 101).

5.11. Producción de alginato.

Una vez que *P. aeruginosa* ha colonizado de forma crónica aparece un morfotipo mucoide (**Figura 39**). Esto se debe a la producción de grandes cantidades de polisacáridos que rodean la célula; este material se ha designado como exopolisacárido mucoide (MEP) y se denomina comúnmente alginato, porque es químicamente similar al polisacárido que normalmente se encuentra en algas marinas^(102,103).



Figura 39. Producción de alginato por *P. aeruginosa* colonias aisladas en agar Luria-Bertani (LB) con NaCl incubado a 37°C por 12 hrs y a 25°C por 24 hrs para aumentar pigmentación. (A) No mucoide, cepa tipo PAO1. (B) Aislamiento cepa mucoide en fibrosis quística FRD1(mucA22)⁽¹⁰⁴⁾.

La colonización inicial se lleva a cabo por cepas no mucoides en pacientes con fibrosis quística, este cambio fenotípico se relaciona con el estrés nutritivo y la hipoxia relativa en el moco respiratorio de los pacientes con este cuadro^(13, 102).

La mucoidia es un término que describe la sobreproducción del exopolisacárido alginato. El MEP está cargado negativamente, es un copolímero lineal y parcialmente acetilado formado por unidades de ácido manurónico y ácido glucorónico unidos por enlaces β (1-4).

P. aeruginosa tiene 24 genes involucrados en la producción y secreción del alginato, ocho de los cuales están implicados en la exportación de ácidos algínicos, doce se encargan de su biosíntesis y solo 4 se involucran en la regulación (**Figura 40**)⁽¹⁰⁴⁾.

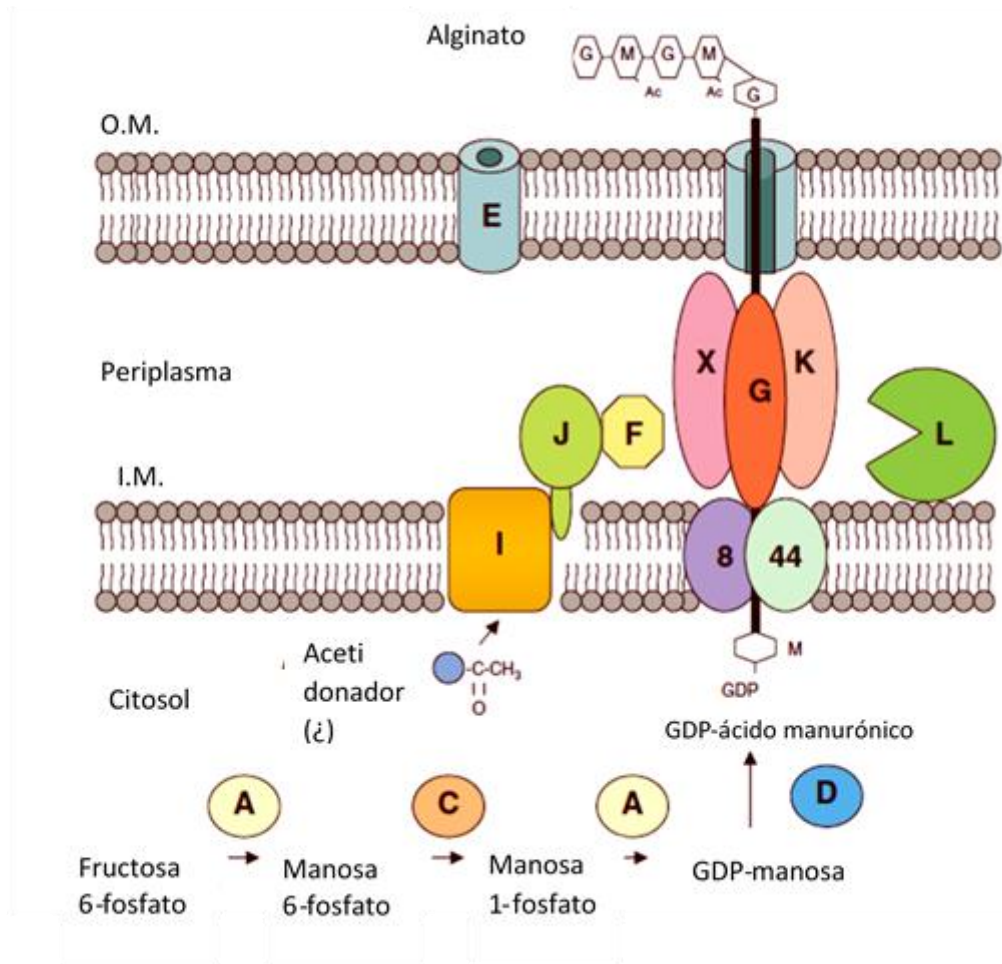


Figura 40. Modelo de la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*. Las letras A-X y números 8 y 44, indican las enzimas involucradas en la biosíntesis (A por Alg A, etc.) I.M y O.M representan dentro y fuera de la membrana respectivamente. Las letras G y M por Guluronato y manuronato. 'Ac' representa un grupo acetil⁽¹⁰⁴⁾.

El alginato es el único antígeno que se relaciona con un peor pronóstico, con la producción de alginato se forman microcolonias, siendo esta forma de crecimiento (biofilm) la estrategia de supervivencia de la bacteria, la cual puede respirar dentro del alginato, usando vías alternativas (nitratos y nitritos) derivados del metabolismo de neutrófilos lisados⁽¹⁰²⁾.

La formación del biofilm está dado por 4 etapas(**Figura 41**):

- Colonización con células no mucoides de *P. aeruginosa*.
- Formación de microcolonias mediada por el pili tipo IV.

- Secreción de moléculas Homoserin lactona para establecer una comunicación célula-célula (quorum sensing). Daño tisular generado por la liberación de toxinas, proteasas y piocianina.
- Pérdida del flagelo y pili tipo IV, síntesis de EPS (exopolímero) y formación de biopelícula⁽¹⁰⁵⁾.

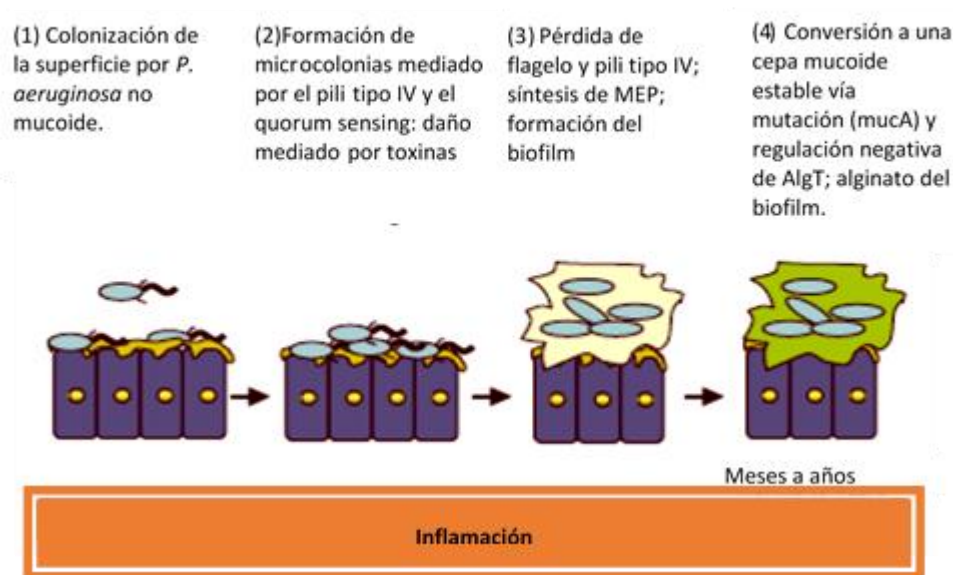


Figura 41. Formación de biofilms durante el proceso infeccioso por *P. aeruginosa*⁽¹⁰⁵⁾.

Las funciones del alginato son la adherencia al epitelio, inhibición de fagocitosis y resistencia a antibióticos, así como protección a las bacterias para la opsonización y neutralización por anticuerpos y complemento⁽¹⁰³⁾.

Las microcolonias aumentan su potencial patógeno en el paciente con Fibrosis quística debido a que las proteasas producen liberación de mucinas, que están sulfonadas y que cuando se combinan con el MEP en presencia de ión calcio forman un gel viscoso que conlleva a un peor aclaramiento⁽¹⁰²⁾.

5.12. *Biopelículas.*

Normalmente las bacterias se estudian suspendidas libremente y se describen con base en sus características de crecimiento en medios de cultivo ricos en nutrientes. Los microbiólogos se enfocan en cultivos puros y en bacterias de vida libre, aunque casi todas las bacterias viven con y dependen de otros microorganismos. Recientemente se ha llegado a la conclusión de que más del 99% de las bacterias existen como biofilms⁽¹⁰⁶⁾.

Los biofilms se definen como un ensamblado de células microbianas asociadas permanentemente con una superficie y encerradas en una matriz compuesta principalmente de polisacárido. La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura, llegando este elemento a representar hasta el 97% de ésta. Además de agua y bacterias, la matriz está formada por exopolisacáridos (EPS), los que constituyen su componente fundamental, producidos por los propios microorganismos integrantes. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, y diversos productos que proceden de la lisis bacteriana. El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas se conocen bajo el nombre de sustancias poliméricas extracelulares (SPE)^(106,107).

Los biofilms se pueden formar en una gran variedad de superficies incluyendo tejidos vivos, aparatos médicos implantados, tuberías de agua potable en ambientes acuáticos naturales. Algunos ejemplos de biofilms son la placa dentobacteriana, la cubierta resbalosa de las piedras de río y la película gelatinosa formada en los floreros⁽¹⁰⁶⁾.

5.12.1. *Formación de biofilm.*

La formación del biofilm, involucra una serie de eventos programados (**Figura 42**). Inicialmente las células se encuentran libres, posteriormente se unen, las células se multiplican hasta formar una capa sobre una superficie sólida, individualmente en la capa pueden exhibir cierta motilidad, a través de espasmos, los cuales dependen del pili tipo IV. Como resultado de la motilidad por espasmos pequeños grupos de *P. aeruginosa* forman microcolonias. Las microcolonias se diferencian para formar un biofilm, que toma la arquitectura de un hongo. Las células dentro de esta estructura están encerradas en una matriz

extra celular de polisacárido (MEP). La estructura cuenta con una innervación de canales de agua que permiten el flujo de nutrientes hacia dentro y productos de desecho hacia afuera⁽¹⁰¹⁾.

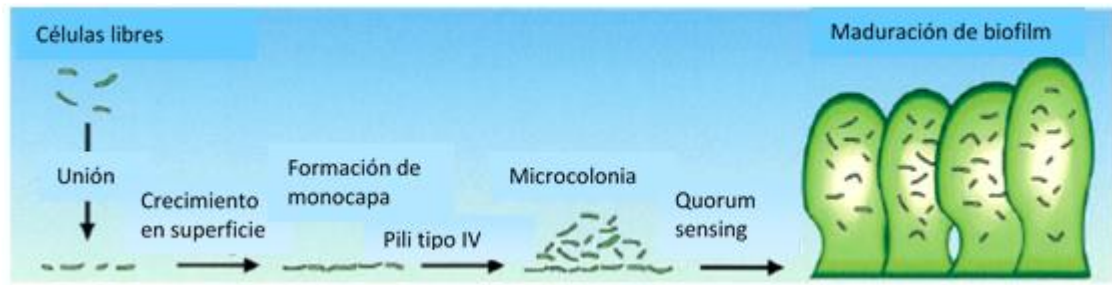


Figura 42. Formación de biofilm de *P. aeruginosa*⁽¹⁰¹⁾.

La biología de los biofilms se centra en su ciclo vital e interacciones con el medio ambiente. El ciclo vital es un proceso dinámico que puede ser dividido en 3 partes: adhesión, crecimiento y separación o desprendimiento.

Adhesión. El sustrato tiene que ser adecuado para la adsorción reversible y, finalmente, la adhesión irreversible de la bacteria a la superficie. Las bacterias una vez percibida la superficie proceden a formar una unión activa con los pili tipo IV. La motilidad, otorgada por los flagelos, ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de adhesión, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente.

Crecimiento. La bacteria, una vez adherida, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia, similar al proceso de formación de placas de agar. A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, las bacterias comienzan a elaborar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm, y este comienza a desplegarse en una formación tridimensional, generando estructuras similares a setas. En *P. aeruginosa*, el polisacárido es un alginato.

Desprendimiento. Luego de que el biofilm ha alcanzado la madurez, algunas células, ya sea aisladamente o en conglomerados bacterianos, se liberan de la matriz para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de formación y desarrollo del biofilm. El desprendimiento puede ser resultado de fuerzas externas al biofilm o de procesos activos inducidos por éste. Los tres principales mecanismos para generar desprendimiento serían:

- Erosión o deslizamiento: remoción continuas de pequeñas partes del biofilm.
- Separación: remoción rápida y masiva.
- Abrasión: Liberación por colisión de partículas del líquido circundante con el biofilm.

La separación proporciona un mecanismo para que las bacterias migren desde zonas densamente colonizadas a áreas que podrían favorecer mejor su desarrollo, logrando así formar nuevos biofilms en sitios distantes.

Para que ocurra la unión de los microorganismos a una superficie y la respectiva formación de un biofilm las bacterias necesitan cerciorarse que han efectuado contacto. Para lograrlo requieren de señales químicas coordinadas que les permitan comunicarse entre ellas. Esta interrelación, vía mensajeros de pequeñas moléculas, denominada quorum sensing, beneficia a la bacteria al permitirle sentir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes.

El proceso quorum-sensing funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal "yo estoy aquí", de manera tal que mientras más bacterias se unen, se incrementa la concentración local de esta señal. Su objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número, ya que los costos de la producción de un biofilm para una bacteria individual superan los beneficios⁽¹⁰⁷⁾.

En la formación de biofilm están implicados dos sistemas diferentes de señalización célula-a-célula: lasR-lasI y rhIR-rhII. Una vez conseguida una densidad suficiente de población, estas señales alcanzan las concentraciones requeridas para activar los genes implicados en la diferenciación del biofilm.

Las mutantes incapaces de elaborar ambas señales producen biofilms notoriamente más delgados y sin su arquitectura típica. Además, pueden ser removidos mucho más fácilmente de superficies mediante uso de surfactantes. La adición de lactona homoserina al medio que contiene los biofilms mutantes da origen a biofilms similares a los de bacterias no mutantes⁽¹⁰⁸⁾.

Los biofilms hospedan un medio ambiente muy dinámico, donde se intercambia material genético tal como plásmidos (ácido desoxirribonucleico extra-cromosómico), enzimas y otras moléculas. Estudios recientes postulan que la matriz de biofilms de *P. aeruginosa* contienen ácido desoxirribonucleico como constituyente principal. Estos estudios, combinados con otros que muestran una tasa de transferencia génica, mediada por plásmidos, enormemente incrementada entre bacterias biofilms, sugieren que la redistribución de genes entre éstas es un proceso continuo con importantes consecuencias en su adaptación evolutiva⁽¹⁰⁷⁾.

5.12.2. Resistencia a antibióticos.

Las bacterias biofilm presentan una organización estructural que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del hospedador. Los biofilms, revestidos con SPE y conteniendo múltiples microcolonias bacterianas en su interior, se convierten en estructuras demasiado grandes como para ser fagocitadas, reduciendo la accesibilidad del sistema inmune a las bacterias. Por añadidura, el biofilm provee de una barrera física que aumenta la resistencia de patógenos a las defensas del hospedador, como opsonización, lisis por complemento, y fagocitosis⁽¹⁰⁷⁾.

Las bacterias que forman biofilms son extremadamente resistentes a antibióticos, esta resistencia puede ser explicada por:

- **Secreción de EPS por las bacterias del biofilm:** Actúa como barrera físico-química. Lo que impide la penetración de anticuerpos o antibióticos. Por otra parte EPS posee carga negativa y funciona como resina de intercambio de iones la cual es capaz de unir a un gran número de moléculas de antibiótico.
- **Tasa de crecimiento bajo:** Las bacterias dentro del biofilm no participan activamente en la división celular, son de tamaño más pequeño y menos permeables a los antibióticos. Prácticamente todos los antimicrobianos son más eficaces para matar las células de rápido crecimiento.
- **Degradación de antibiótico por enzimas:** Enzimas tales como las β -lactamasas pueden ser inmovilizadas en la matriz del EPS de modo que las moléculas de antibióticos que ingresan pueden ser inactivados de manera efectiva. Es interesante

el hecho de que *P. aeruginosa* en un biofilm produce 32 veces más β -lactamasas que su forma planctónica.

- **Alteración de la composición de la pared celular:** Cerca del 40% de la pared celular es diferente en comparación con bacterias planctónicas ⁽¹⁰⁹⁾.

5.13. Motilidad.

P. aeruginosa tiene dos formas de desplazarse, en medios líquidos se desplaza "nadando" mediante un único flagelo polar, mientras que sobre las superficies se mueve, independientemente de la presencia del flagelo, por un mecanismo llamado "twitching" o motilidad por espasmos que depende de las fimbrias o pili tipo IV, estos dos tipos de desplazamiento están involucrados en la formación de biopelículas. La motilidad mediada por flagelos parece ser importantes en la formación de la monocapa en la superficie abiótica. El pili tipo IV juega un papel importante en la formación de microcolonias(**Figura 43**)⁽¹¹⁰⁾.

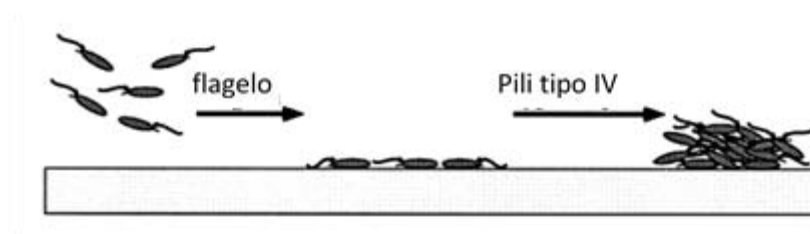


Figura 43. Esquema de formación de biofilms⁽¹¹⁰⁾.

Los flagelos (**Figura 44**) son unos propulsores en forma de cuerda que están formados por unas subunidades proteicas enrolladas helicoidalmente (flagelina); así mismo se unen a las membranas de las bacterias mediante unas estructuras (gancho y cuerpo basal) y se impulsan por el potencial de membrana. Los flagelos proporcionan motilidad a las bacterias y permiten que la célula se dirija hacia los nutrientes y evite las sustancias tóxicas (quimiotaxis). Las bacterias se acercan a sus nutrientes nadando en línea recta para girar luego bruscamente y continuar en una nueva dirección. Este periodo de desplazamiento aumenta a medida que se incrementa la concentración de la sustancia quimioatrayente. La dirección de giro flagelar determina si las bacterias continúan nadando o bien giran⁽³⁾.

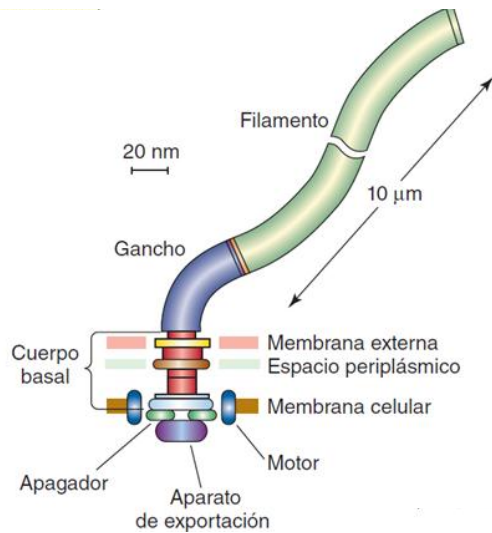


Figura 44. Estructura de flagelo en bacterias Gram negativas⁽¹⁾.

La colonización de nuevas superficies bajo condiciones de alta disponibilidad de nutrientes ocurre vía flagelo-independiente, en una translocación de bacterias conocida como motilidad “*twitching*”. Esto ocurre sobre superficies húmedas y es importante para la colonización del hospedero y otras formas de comportamiento que incluyan complejos coloniales, incluyendo biofilms. Esta mediada por pili tipo IV que además de actuar como organelo de motilidad, funciona como adhesina mediando la adherencia a la superficie celular de células eucariotas. El pili tipo IV, son filamentos flexibles en la superficie celular de aproximadamente 6nm de diámetro, varios micrómetros de longitud y muy fuertes en la tensión debido a los enlaces hidrofóbicos e iónicos. Son polímeros productos de un solo gen llamado pili A o pilin, que es una proteína derivada de un precursor por escisión de sus 6 Residuos N-terminal y la metilación de fenilalanina.

La motilidad tipo *Twitching* esta descrita como una manera de translocación sobre superficies, caracterizada por tirones cortos e intermitentes, la cual requiere de un número mínimo de células presentes. Este tipo de movimiento puede ser detectado en placas mediante la expansión de la colonia. Se caracteriza por la presencia de un halo delgado alrededor de la colonia original, el cual consiste de una capa delgada de células. En medios de cultivo se aprecian colonias planas y difusas, con una característica apariencia rugosa^(111,112).

5.14. *Secreción de proteínas*

En las bacterias como *P. aeruginosa*, la envoltura celular se compone de dos membranas hidrófobas. Las membranas interior y exterior están separadas por un espacio hidrófilo, el periplasma. Las proteínas secretadas, enzimas o toxinas, tienen que viajar a través del ambiente hidrofóbico de las membranas. Estas proteínas son generalmente grandes moléculas hidrofílicas y por lo tanto tienen que ser alojadas en los canales acuosos u otro tipo de conductos de las células. Estas rutas de acceso al medio externo se construyen a través un conjunto sofisticados complejos macromoleculares que podemos llamar máquinas de secreción. La composición y la naturaleza de estos complejos pueden variar, pero están ampliamente conservadas a través de las bacterias Gram negativas. Hoy en día, se han identificado seis tipos diferentes con base en las características de proteínas / componentes que forman la máquina de secreción. Estos son los llamados de tipo I a tipo sistemas de secreción VI. Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan. Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal^(113,114).

5.14.1. *Sistema de secreción tipo I*

Es una vía Sec-independiente, por lo que no se requiere del procesamiento de un péptido líder para atravesar la membrana citoplásmica; la secreción proteica se da en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular. Los sustratos a exportarse por este sistema presentan una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal, sin embargo, no es procesada. Esta señal es específica para ciertas subfamilias de sustratos como por ejemplo, las proteasas. El Sistema de secreción tipo I (SSTI) está constituido por tres componentes: un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador ABC (de sus siglas en inglés *ATP binding cassette*) en la membrana interna (MI) y una proteína periplásmica que también está anclada a la MI y que se denomina PF (proteína de fusión).

El sustrato se reconoce a través de una secuencia señal en el extremo carboxilo terminal (marcado con rojo). En este modelo de secreción, la proteína periplásmica de fusión PF interactúa con el transportador ABC en la MI y con la proteína PME que forma un canal en la ME (Figura 45). En *P. aeruginosa* la proteasa alcalina codificada por el gen *aprA* se secreta por esta vía; participan en su secreción las proteínas AprD, AprE, y AprF^(2,114).

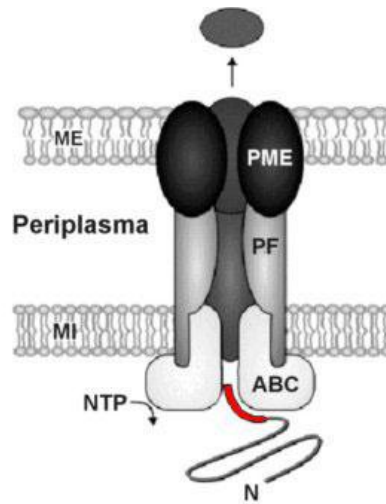


Figura 45. Componentes de SSTI⁽¹¹⁴⁾.

5.14.2. Sistema de secreción tipo II

La vía de secreción tipo II, también llamada vía de secreción general, es la responsable de la secreción de la mayoría de las proteínas extracelulares en bacterias Gram-negativas, aunque *E. coli* y *Salmonella* no la presentan. Es una ruta de secreción de dos pasos dependiente del sistema Sec y del péptido señal en el extremo amino de las proteínas que se translocan (Figura 46)^(2,113).

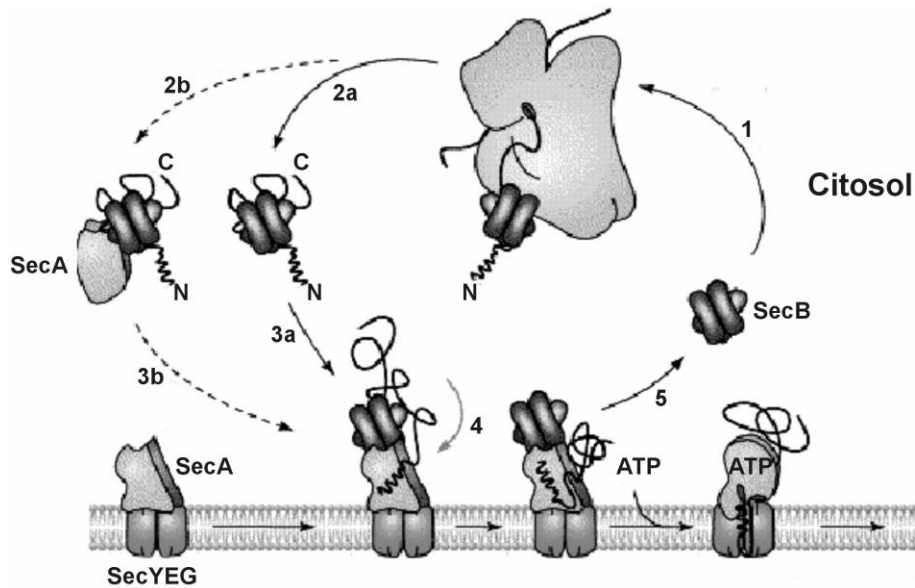


Figura 46. Modelo del mecanismo de translocación a través de la MI por el sistema Sec. En el paso 1 la proteína chaperona Sec B se une a una preproteína naciente en el citosol, estabilizando su conformación desplegada (paso 2a). El complejo binario SecB-preproteína es dirigido hacia la translocasa SecYEG unida a SecA (paso 3a), o bien, primero se asocia con SecA (paso 2b) y después se dirige a la MI a reemplazar a SecA unida a SecYEG (paso 3b). En el paso 4 se une la secuencia señal a SecA, lo cual estabiliza la interacción SecB-SecA y la preproteína se transfiere a SecA. La unión de ATP por SecA promueve el inicio de la translocación y la liberación de SecB del complejo ternario (paso 5)⁽¹¹⁴⁾.

Una vez en el espacio periplásmico, las proteínas se translocan por un conjunto de 12 a 14 proteínas, que en *P. aeruginosa* se denominan Xcp. Las proteínas que se transportan por este sistema son: elastasa (LasB), lipasa (LipA), exotoxina A, fosfolipasa C (PlcH) y fosfatasa alcalina (PhoA). La transcripción de los genes que codifican para varias de las proteínas que se secretan por esta vía está regulada por el sistema "sensor de quorum" que adicionalmente regula a los genes *xcp*^(2,114).

Existe un segundo grupo de genes T2SS que se llama *hxc*. La organización genética de los grupos *hxc* y *xcp* es diferente⁽¹¹³⁾.

5.14.3. Sistema de secreción tipo III

Este sistema dependiente del contacto con células, los sustratos se inyectan directamente desde el citoplasma bacteriano hasta el citosol de las células eucariotas. Se han asociado 36 genes con la función de este sistema de secreción y está encargado de la secreción de más de 20 proteínas diferentes cuyos componentes en *P. aeruginosa* se llaman Psc, Pop, o PCR.

Los componentes de T3SS asemejan una aguja curva cuya forma es fundamental en el proceso de inyección, un conjunto de tres proteínas PopBD y PcrV son cruciales para establecer un poro en la membrana de las células eucariotas de 2.8-6 nm, denominado translocon. En *P. aeruginosa* varias exotoxinas se translocan a las células eucariotas mediante este sistema tipo III. Entre estas toxinas se encuentran las exotoxinas S y T que bloquean la transducción de señales de la célula infectada mediante su actividad de ADP-ribosil-transferasa, así como la exotoxina Y, descrita recientemente, que eleva el Amp cíclico, pues tiene actividad de adenilato ciclasa. Las proteínas que intervienen en el tipo de secreción III tienen homología estructural con proteínas que intervienen en el ensamble del flagelo^(2,113).

5.14.4. Sistema de secreción tipo V.

Sistema de secreción Sec dependiente, ya que utiliza la maquinaria Sec para atravesar la MI; sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior de la célula, es el más simple de todos. Básicamente toda la información para la secreción está contenida en un polipéptido. La proteína a secretarse presenta tres regiones diferentes funcionales: una secuencia señal en el amino terminal para atravesar la MI, seguida de un dominio también llamado pasajero que dará origen a la proteína expuesta a la superficie celular y el dominio en el carboxilo terminal, que permite la secreción a través de la ME formando una estructura de barril. El péptido líder dirige la secreción vía el sistema Sec y se procesa en la cara periplasmática de la MI. El dominio β del intermediario periplásmico adquiere la conformación de barril- β y se inserta en la ME para formar el poro. Por último se transloca el dominio pasajero a la superficie celular en donde puede permanecer unido o bien procesarse (**Figura 47**). El *P. aeruginosa* PAO1 el genoma contiene tres genes que codifican proteínas con un C-terminal de β -barril autotransporter típico unido a un dominio N-terminal de pasajeros, denominados T5bSS o TPS, T5aSS y T5dSS^(113,114).

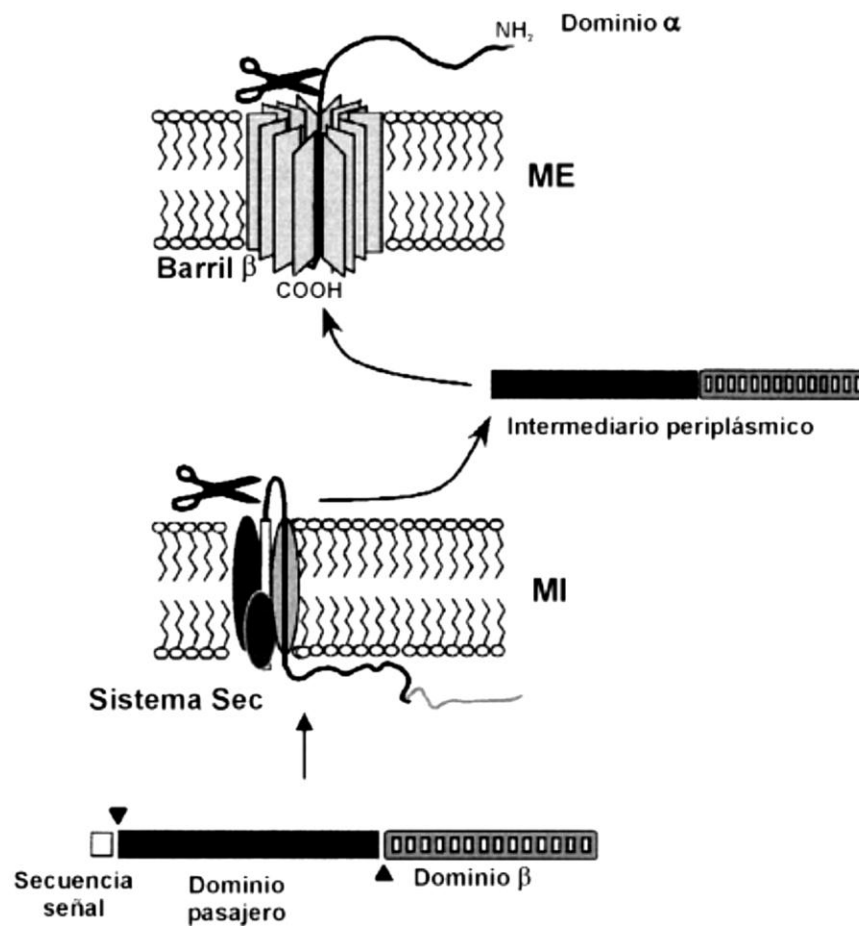


Figura 47. Mecanismo de secreción tipo V⁽¹¹⁴⁾.

5.14.5. Sistema de secreción tipo VI.

Todavía no está claro si el T6SS es definitivamente un mecanismo de un solo paso. En *P. aeruginosa* hay tres diferentes grupos de genes que codifican un conjunto de 15 a 20 genes implicados en la función T6SS, son denominados H1-T6SS a H3-T6SS, actualmente se reconocen tres efectores conocido como Tse1-3. Es importante destacar que la proteína Tse2 es una toxina capaz de matar bacterias de la competencia. El gen Tse2 está agrupado con un gen llamado tsi2. El gen tsi2 codifica una proteína que protege la cepa productora del efecto de la toxina Tse2⁽¹¹⁴⁾

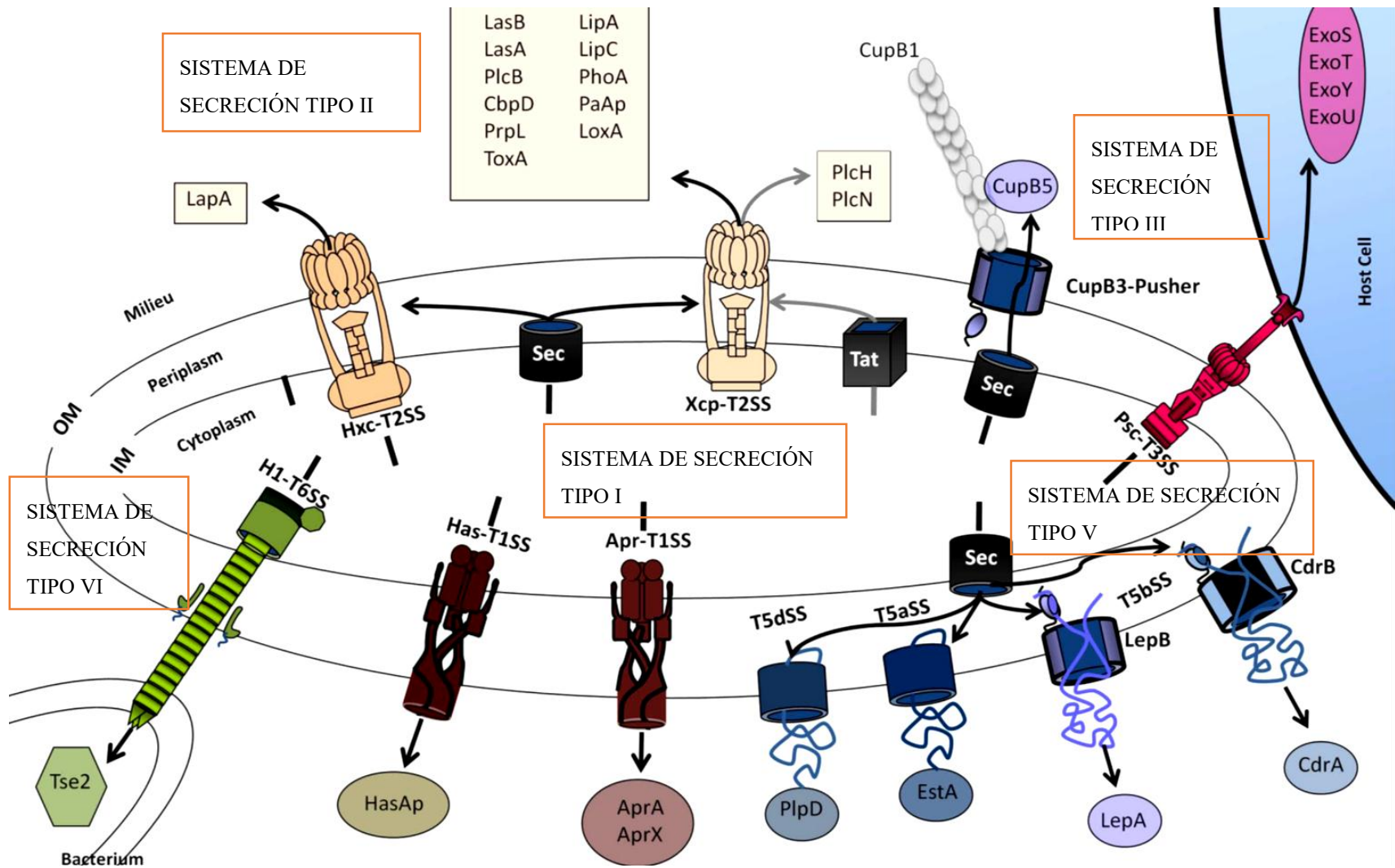


Figura 48. Sistemas de secreción en *P. aeruginosa*⁽¹¹⁴⁾.

5.15. Producción de biosurfactantes

Los surfactantes son compuestos anfipáticos, estructuralmente sus moléculas presentan dos partes diferentes, una hidrofóbica o polar compuesta de un carbohidrato (ramnosa, trealosa, manosa) o un aminoácido y la región hidrofóbica o no polar constituida de una cadena hidrocarbonada de longitud variable (ácido grasos saturados e insaturados; pueden ser aniónicos, catiónicos y switeriónicos. Los surfactantes de origen biológico o biosurfactantes son un grupo estructuralmente diverso de moléculas tensoactivas, que presentan en general menor toxicidad y mayor biodegradabilidad que los surfactantes sintéticos^(115,116).

Los biosurfactantes generalmente son metabolitos secundarios excretados por los microorganismos, su principal papel fisiológico es el de permitir crecer a los microorganismos en sustratos inmiscibles en agua mediante la reducción de la tensión superficial de la interfase, dicha función le permite incrementar la transferencia de masa ya que hacen que aquellas fuentes de carbono de baja solubilidad estén más disponibles para su biodegradación e incorporarlos a rutas metabólicas convergentes para la generación de energía y síntesis de biomasa. La naturaleza química de los biosurfactantes es muy variada(**Figura 49**); Glucolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos, complejos de proteína-polisacárido, péptidos, fosfolípidos y lípidos naturales (**Tabla 25**)^(115,117,118).

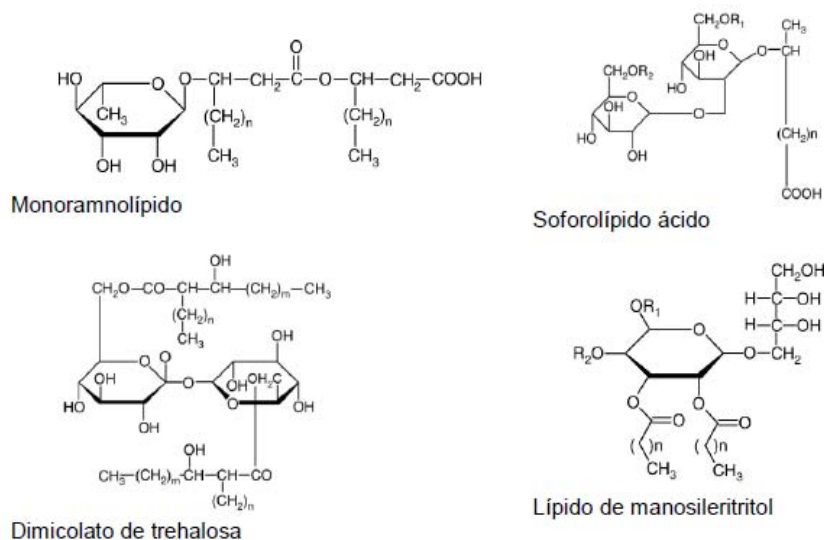


Figura 49 Estructuras químicas generales de los glucolípidos microbianos⁽¹¹⁹⁾.

Tabla 25. Clasificación y origen microbiano de biosurfactantes⁽¹¹⁸⁾.

| Tipo de surfactantes | Microorganismo |
|--|--|
| Ramrólpidos | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| Trehalípidos | <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Mycobacterium spp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> |
| Soforólpidos | <i>Candida apícola</i> <i>Candida lipolytica</i> |
| Lípidos de Glucosa-sacarosa-fructosa | <i>Arthrobacter spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>R. erythropolis</i> |
| Lípidos de celobiosa. | <i>Ustilago maydis</i> |
| Lípidos de poliol. | <i>Rhodotorula glutinus</i> <i>Rhodotorula graminus</i> |
| Diglucosil digliceridos | <i>Lactobacillus fermenti</i> |
| Lipopolisacáridos | <i>Acinetobacter calcoaceticus (RAG1)</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Candida lipolytica</i> |
| Lipopéptidos | <i>Arthrobacter spp.</i> <i>Bacillus pumilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| Péptidos de lisina y ornitina | <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> |
| Fosfolípidos | <i>T. thiooxidans</i> <i>Corynebacterium alkanolyticum</i> |
| Sulfonilípidos | <i>Capnocytophaga spp.</i> |
| Ácidos grasos (ácido corionomicólico, ácido spiculisporico, etc.) | <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Talaromyces trachyspermus</i> |

Entre las aplicaciones más estudiadas de los biosurfactantes están aquellas relacionadas con la industria del petróleo y la biorremediación de sitios o residuos contaminados con hidrocarburos. En los últimos años ha crecido el interés por evaluar la potencial utilidad de los biosurfactantes en las disciplinas médicas y veterinarias, dado que existen estudios que demuestran propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales e incluso antitumorales en estos compuestos. Además, los biosurfactantes también han mostrado contrarrestar la adhesión y la formación de biofilms de microorganismos patógenos⁽¹¹⁹⁾.

5.16. Ramnolípidos

P. aeruginosa es capaz de utilizar varios compuestos orgánicos como fuente de alimentos lo cual le da una excepcional capacidad para colonizar nichos ecológicos donde los nutrientes son limitados. Es capaz de producir un tipo específico de biosurfactantes denominados ramnolípidos cuando se cultiva en las condiciones adecuadas. Los ramnolípidos son un grupo de biosurfactantes glicolípidos compuestos de una cabeza hidrófila constituida por una o dos moléculas de ramnosa y una cola hidrófoba formada por uno o dos ácidos grasos, llamados respectivamente monoramnolípidos y Diramnolípidos (diRL) (**Figura 50**). El tipo de los ramnolípidos producidos depende de la cepa bacteriana. En cuanto a su producción se muestran altos rendimientos en comparación con otros biosurfactantes y puede utilizar como materias primas diversas fuentes de carbono. En particular los aceites de origen vegetal, tales como el de soya, maíz u olivo que proporcionan un mayor rendimiento^(120,121).

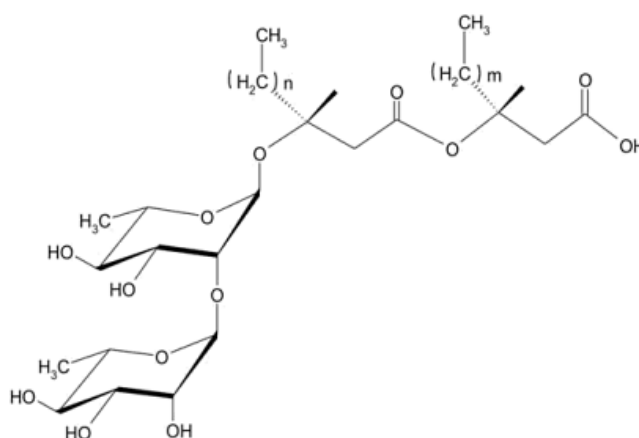


Figura 50. Estructura química de diramnolípido producido por *P. aeruginosa*⁽¹²⁰⁾.

Los ramnolípidos son compuestos tensoactivos, que pueden reducir la tensión superficial del agua a valores los a 30 nM / m. La CMC de ramnolípidos puros y sus mezclas depende en gran medida de la composición química, que van desde 50 a 200 mg/L.

Los ramnolípidos son biológicamente interesantes, debido a que se comportan como exotoxinas, restringiendo el crecimiento de cultivos de *Bacillus subtilis*, además de que presentan actividad zoospórica en varias especies fitopatógenas. Tales cualidades se atribuyen a la acción de los ramnolípidos sobre los lípidos de la membrana celular⁽¹²⁰⁾.

5.16.1. Biosíntesis de ramnolípidos

En la síntesis de ramnolípidos por *P. aeruginosa* (**Figura 51**), actúan como moléculas precursoras deoxi-Timidina-difosfo-L-ramnosa (dTTP-L-ramnosa) procedente de la gluconeogénesis y B-hidroxiácidos procedente de la síntesis de ácidos grasos. La síntesis de la parte hidrofóbica del glicolípido incluye la acción de RhlA que cataliza la transferencia de grupos β -hidroxialcanoilo desde la proteína transportadora de grupos acilo (ACP) para dar lugar a los HAA (ácidos β -hidroxialcanoil- β -hidroxialcanoicos) que generalmente tienen 10 átomos de carbono. La glucosa 6-P procedente de la gluconeogénesis se transforma en glucosa-1-P por la actividad de la fosfoglucomutasa de Alg C, que también está involucrada en la síntesis de lipopolisacárido y de alginato. Tras sucesivas reacciones se obtiene dTTP-L-ramnosa y tienen lugar dos reacciones de glicosilación llevadas a cabo por dos enzimas ramnosiltransferasas específicas, Rhl B (Ramnosiltransferasa 1) y RhlC (Ramnosiltransferasa 2)⁽¹²²⁾.

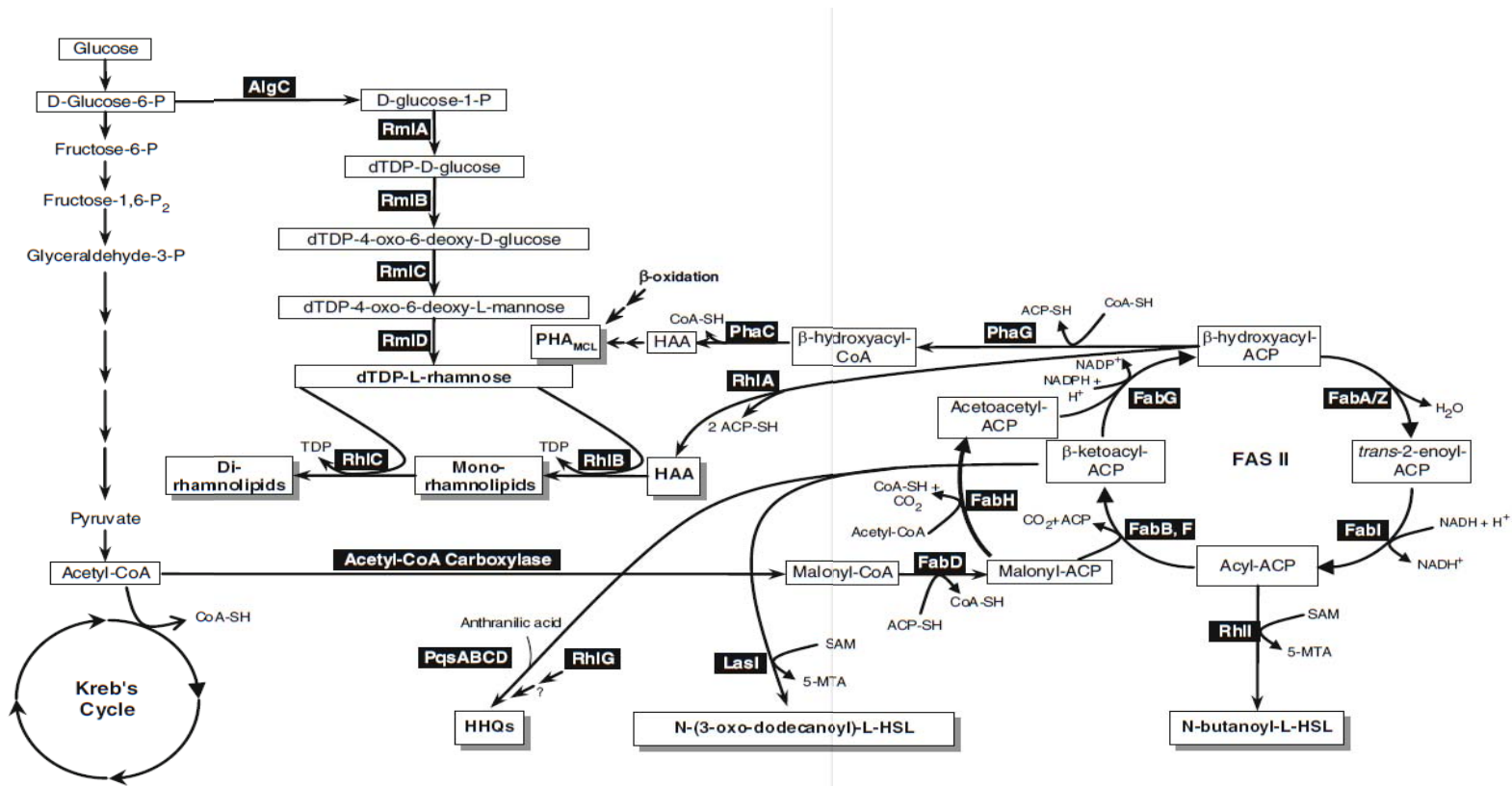


Figura 51. Ruta metabólica de la biosíntesis de ramnolipidos y su relación con la biosíntesis de polihidroxicanoatos (PHA) y las moléculas del sistema sensing quorum. AlgC: fosfomanomutasa, RmlA: glucosa-1-fosfato timidiltransferasa, RmlB: dTDP-D-glucosa 4,6-dehidratasa, RmlC: dTDP-4-dehidroramnosa 3,5-epimerasa, RmlD: dTDP-4-dihidroramnosa reductasa, FabD: malonil-CoA: ACP transacilasa, FabH, FabB and FabF: β -ketoacil-ACP sintetasa, FabG: β -ketoacil-ACP reductasa NADH-dependiente, FabA, FabZ: β -hidroxiacil-ACP dehidratasa, FabI: enoil-ACP reductasa, HAA: 3-(3-hidroxi)alcanoil) ácido alcanoico, PqsABCD: 4-hidroxi-2-heptilquinolina clúster de síntesis, RhlA: 3-(3-hidroxi)alcanoil)alcanoato sintetasa, RhlB: ramnosiltransferasa 1, RhlC: ramnosiltransferasa 2, RhlI: N-butanoyl-L-HSL sintetasa, RhlG: β -ketoacil reductasa, PhaG: (R)-3- hidroxi)decanoil-ACP: CoA transacilasa, PhaC: PHA sintetasa, LasI: N-(3-oxo-dodecanoil)-L-HSL sintetasa, HHQ: 4-hidroxi-2-hetilquinolina, PHAMCL: poly(3-hidroxi)alcanoatos) de cadena entre C6-C14, SAM: S-adenosilmetionina, 5-MTA: 5'-metiltioadenosina⁽¹²²⁾.

La ruta de biosíntesis de mono y diramnolípidos, involucra la participación de ramnosiltransferasas RhIB y RhIC. La producción de ramnolípidos en *P. aeruginosa* está fuertemente controlada por regulación genética (transcripcional y postranscripcional) en los operones *rmlBDAC* y *rhlAB* que responden a una amplia variedad de condiciones ambientales y señales fisiológicas denominadas quorum sensing. Adicionalmente se conoce que un exceso en la fuente de carbono y un estrés en la fuente de nitrógeno, favorecen la producción de ramnolípidos.

Reacciones para la producción de ramnolípidos(**Figura 52**):

- 1) La enzima Rh1A está involucrada en la síntesis del dímero de ácidos grasos de los ramnolípidos y de los ácidos 2-(3-hidroxicanoiloxi) alcanóico (HAAs) libres. Parece ser que la Rh1A está unida a la membrana interna.
- 2) Reacción catalizada por la ramnosiltransferasa Rh1B unida a la membrana, usa desoximitimidina di-fosfato de ramnosa (dTDP-L-ramnosa) y HAAs como precursores para la producción de mono-ramnolípidos.
- 3) Producción de di-ramnolípidos por la enzima Rh1C cuyos sustratos son dTDP-L-ramnosa y mono-ramnolípidos⁽¹²¹⁾.

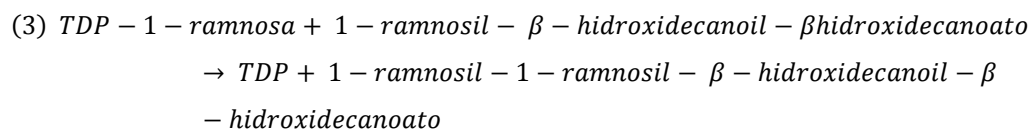
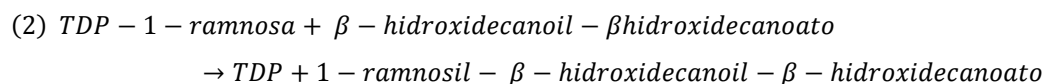
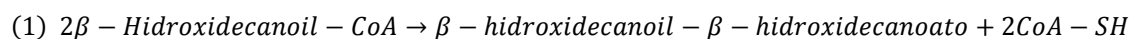


Figura 52. Reacciones involucradas en la biosíntesis de ramnolípidos⁽¹²¹⁾.

La síntesis de ramnolípidos está regulada por un sistema sensor del quorum o de señalización célula-célula⁽¹²³⁾.

La producción de ramnolípidos está regulada por el sistema de autoinductores RhIR-RhII. La proteína reguladora RhIR es activada por la unión de los autoinductores, el factor 2 y/o VAI, los cuales son producidos por la RhII sintetasa. La expresión de gen *rhlI* está controlada por el regulador RhIR. La unión de la proteína RhIR activada al sitio blanco “upstream” de la

región rhUA promueve la transcripción del operón rhlAB que codifica para la ramnosiltransferasa, enzima clave para la síntesis de ramnolípidos(**Figura 53**)⁽¹²⁴⁾.

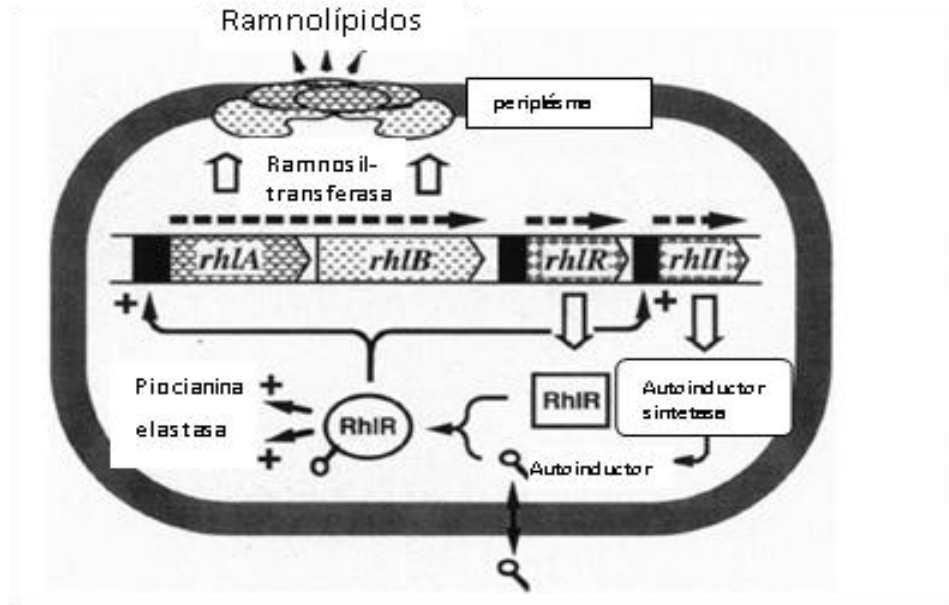


Figura 53. Regulación de la producción de ramnolípidos en *P. aeruginosa*⁽¹²⁴⁾.

5.16.2. Aplicaciones potenciales de los ramnolípidos

Biorremediación. *P. aeruginosa* posee la capacidad de metabolizar gran variedad de sustratos incluyendo n-alcenos, hexadecano y aceites. Los ramnolípidos promueven la interacción entre el sustrato hidrófobo y la célula, de tal forma que *P. aeruginosa* lo absorba⁽¹²⁵⁾.

Actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que tienen actividad contra una gama de bacterias, incluyendo *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con concentraciones inhibitorias entre 0.5 g/mL a 32 g/mL. Actividad contra varios hongos como *Fusarium solani* y *Penicillium funiculosum* con CIM de 75 g/mL y 16 g/mL. El modo de acción es debido a la formación de poros en la membrana celular debido a la intercalación de ramnolípidos⁽¹²⁶⁾.

Factor de virulencia. Solubilizan el agente tensoactivo pulmonar, lo que permite el acceso a las membranas celulares a la fosfolipasa C. Además de la inhibición y la destrucción de las

células epiteliales pulmonares, los ramnolípidos son capaces de destruir a los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos e inhiben la fagocitosis⁽¹²⁷⁾.

Formación del biofilm. Los ramnolípidos promueven la motilidad, previniendo que las células se adhieran firmemente al sustrato. Durante el desarrollo del biofilm sirven para crear canales para el flujo de agua y oxígeno⁽¹²⁸⁾.

Motilidad. Los ramnolípidos juegan un papel importante en la motilidad por espasmo disminuyendo la tensión superficial⁽¹²¹⁾.

Los ramnolípidos de *P. aeruginosa* se están actualmente comercializado por Jeneil biosurfactant Co. & Jeneil Biotech. Inc. (Saukville, WIS, EE.UU) como fungicida para agricultura o un aditivo para mejorar las actividades biorremediación. Los ramnolípidos que denomina dicha empresa como tipo I y tipo II son adecuados para el lavado de suelos y remoción de metales pesados, mientras los tipo III son para el procesamiento de metales, procesamiento de cuero, lubricantes, procesamiento de pulpa y papel y finalmente los tipo IV pueden ser usados en textiles, limpiadores, alimentos, tintas, pinturas, adhesivos, productos de cuidado personal, adyuvante de agricultura y para el tratamiento de agua contaminada⁽¹²⁵⁾.

5.17. Producción de Polihidroxialcanoatos

En los últimos años ha aumentado el interés por el desarrollo y producción de polímeros biodegradables buscando resolver el problema actual de la contaminación causada por el uso de polímeros sintéticos derivados del petróleo. Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros biodegradables sintetizados por bacterias que los acumulan en forma de inclusiones citoplasmáticas cuando crecen en sustratos ricos en fuentes de carbono y con desbalances de nitrógeno, fósforo y/o azufre, oxígeno o magnesio. Los PHAs son acumulados en las células como discretos gránulos, el tamaño y número varía dependiendo de las diferentes especies, se pueden observar mediante microscopía electrónica como cuerpos de inclusión con envoltura proteica (**Figura 54**). Dependiendo de la cinética de acumulación de PHAs las bacterias pueden dividirse en dos grupos. El primer grupo está formado por las bacterias que requieren la limitación de algunos nutrientes, tal como *Ralstonia eutropha*. El segundo grupo no depende de limitación nutricional acumulan PHAs durante el crecimiento celular, como es el caso de *P. aeruginosa*. Los PHAs almacenados pueden ser degradados por despolimerasas y metabolizados como fuente de carbono y energía tan pronto como la limitante de nutrientes sea restaurada. Los microorganismos segregan enzimas denominadas hidroxilácidos que descomponen al polímero en sus componentes moleculares para poder utilizar el carbono⁽¹²⁹⁻¹³¹⁾.



Figura . Electromicrografía de inclusiones de PHAs en *P. aeruginosa* 42A2⁽¹³¹⁾.

Los PHAs son poliésteres de hidroxialcanoatos(**Figura 55**):

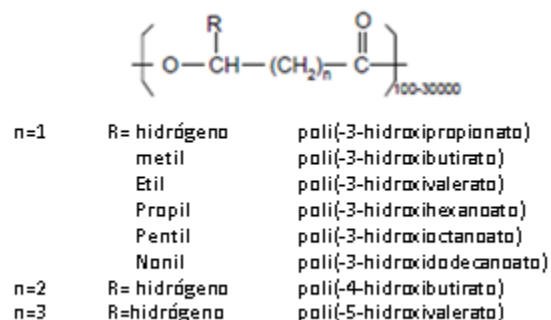


Figura Estructura general de los polihidroxialcanoatos⁽¹²⁹⁾.

Los PHAs se clasifican dependiendo del número de carbonos presentes en cada monómero:

- PHAs de cadena corta con 3-5 átomos de carbono: Poli-3-hidroxivalerato ([P(3HV)]) y el Poli-3-hidroxibutirato [P(3HB)].
- PHAs de cadena media con 6 a 14 carbonos: Copolímero poli-3(HB-co-HV).
- PHAs de cadena mixta: combinan los dos anteriores, como el Poli (3HB-co-3HV-co-3HHx)⁽¹³²⁾.

Dependiendo de su número de carbonos, los PHAs presentan diferentes niveles de cristalinidad y elasticidad, siendo dichas propiedades clave para sus aplicaciones en los campos industriales. *P. aeruginosa* produce polihidroxialcanoatos de cadena media (PHAs-mcl)^(133,134).

Los PHAs son termoplásticos biodegradables, biocompatibles y no tóxicos. Tienen un alto grado de polimerización, son altamente cristalinos, ópticamente activos, isotáctico e insoluble en agua, tales características los hacen competitivos con el polipropileno. Se degradan tras la exposición a tierra, composta o los sedimentos marinos, la biodegradación es dependiente de un número de factores tales como la actividad microbiana del medio ambiente y el área de superficie expuesta, la humedad, la temperatura, pH, el peso molecular. Los productos finales de la degradación de PHAs en ambientes aeróbicos son dióxido de carbono y agua. Se pueden extraer con disolventes como el cloroformo, cloruro de metileno, carbonato de propileno y dicloroetano, la desventaja es que se requiere una alta cantidad de disolvente debido a la alta viscosidad, resultando costoso^(129,130).

La síntesis de PHAs bacterianos requiere de la enzima polihidroxicanoato sintasa, codificada por el gen *phaC* (**Figura 56**). Existen 4 tipos de enzimas PHA sintasas (I-IV). Las sintasas PHA tipo II, presentes en *P. aeruginosa*, contienen dos genes sintasas (*phaC1* y *phaC2*) separados por el gen *phaZ*, cuyo producto enzimático actúa en la despolimerización de éstos compuestos, comprenden enzimas que consisten de un solo tipo de subunidad (PhaC) con masas moleculares entre 61 y 68 kDa⁽¹³³⁾.

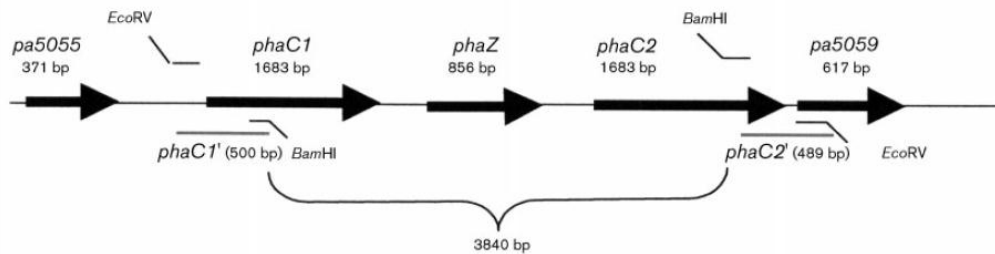


Figura . Representación esquemática del gen de PHA tipo II en *P. aeruginosa*⁽¹³⁰⁾.

Se han dilucidado 4 rutas metabólicas para la biosíntesis de PHA en la bacteria *Alcaligenes eutrophus* (**Figura 57**), productor de polihidroxibutirato (PHB) el cual está perfectamente caracterizado, es sintetizado a partir de acetyl-CoA por una secuencia de 3 reacciones enzimáticas (**Figura 58**).

- 1) Condensación de 2 acetyl CoA para formar acetoacetyl-CoA reacción catalizada por la enzima 3-cetotilasa.
- 2) Reducción del acetoacetyl-CoA a R(-)-3-hidroxibutiril-CoA por la enzima acetoacetyl-CoA reductasa.
- 3) Síntesis del PHAs por la polimerización de R(-)-3-hidroxibutiril-CoA para formar PHB⁽¹³⁰⁾.

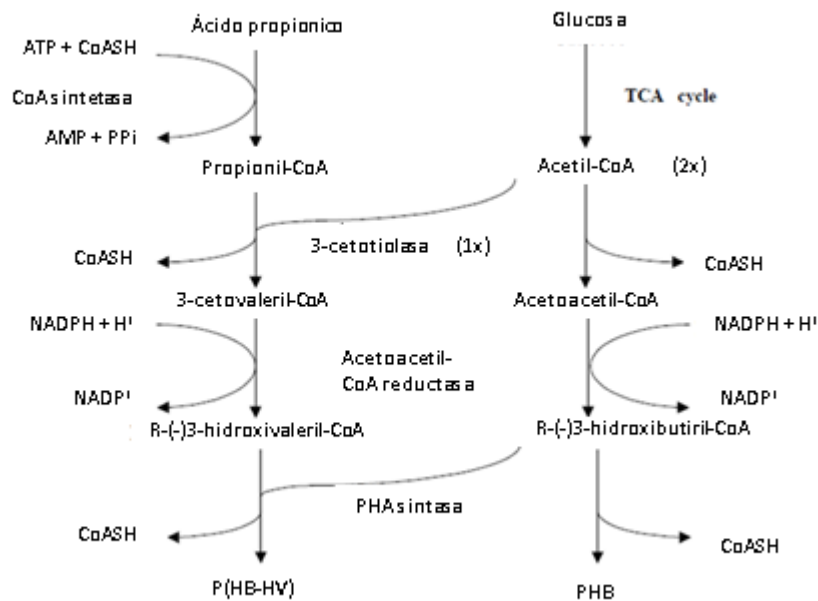


Figura 57. Ruta metabólica de PHB y P(HB-HV) en *Alcaligenes eutrophus*⁽¹²⁹⁾.

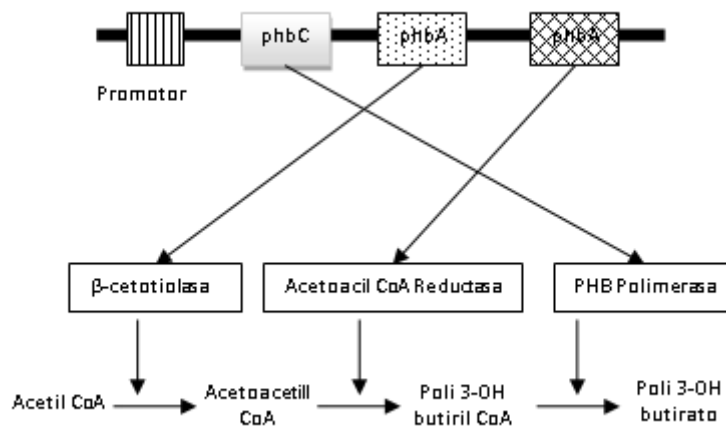


Figura 58. Biosíntesis de 3-polihidroxiutarato por la acción sucesiva de β -cetoacil-CoA tialasa (phbA), acetoacetyl-CoA reductasa (phbB) y PHB polimerasa (phbC). Los genes del operón phbCAB codifican para las tres enzimas. El promotor (P) de phbC transcribe por completo el operón (phbCAB)⁽¹³⁰⁾.

La composición de los PHAs depende de las PHA sintasas, la fuente de carbón y la ruta metabólica involucrada. Esto ha sido confirmado por la purificación de PHA_{MCL} sintasas, enzimas clave en la síntesis de PHAs, la actividad enzimática de *P. aeruginosa* in vitro utilizando como sustrato (R)-3-hidroxidecanoil-CoA. Este sustrato es derivado de la síntesis

de ácidos grasos, producto de la reacción catalizada por la enzima transacilasa del 3-hidroxiacil-ACP a su correspondiente CoA tioester. La acumulación intracelular de PHAs compite con la biosíntesis de alginato y juega un papel importante en la tolerancia al estrés y formación del biofilm. Además la PHA sintasa no está directamente involucrada en la síntesis de ramnolipidos, la cual depende de la disponibilidad del precursor 3- β -hidrodecanoil-3- β -hidroxidecanoato que puede ser sintetizado por la PHA sintasa⁽¹³²⁾.

Debido a su naturaleza lipídica, la detección y aislamiento de bacterias productoras de PHAs se fundamenta en la utilización de colorantes lipofílicos como el negro Sudán, el azul Nilo, rojo Nilo. En los últimos años, su utilización para detectar bacterias productoras de PHAs es acompañada de pruebas moleculares confirmatorias basadas en PCR que detectan la presencia de uno o varios de los genes de biosíntesis de PHAs⁽¹³³⁾.

Los PHAs se producen a partir de una amplia variedad de sustratos tales como recursos renovables (sacarosa, almidón, celulosa, triglicéridos), los recursos fósiles (metano, aceite mineral, hulla), subproductos (melaza, suero de leche, glicerol), productos químicos (ácido propiónico, ácido 4-hidroxibutírico) y dióxido de carbono. *P. aeruginosa* es capaz de utilizar como sustrato desechos residuales provenientes de procesos de fritura y otros desechos oleosos^(130,131).

Los polihidroxialcanoatos tienen una amplia gama de aplicaciones debido a sus características, tales como el envasado (bolsas, contenedores), materia prima para la elaboración de artículos desechables (pañales, utensilios, productos de higiene íntima, botellas, tazas). Los PHAs se consideran una fuente para la síntesis de compuestos quirales y son materia prima para la producción de pinturas. Se utilizan como portador de medicamentos a largo plazo (medicamentos, hormonas, insecticidas herbicidas) sin embargo, las aplicaciones médicas y farmacéuticas están limitadas debido a la lenta biodegradación y alta estabilidad hidráulica en los tejidos estériles⁽¹³²⁾.

5.18. *Degradación de alcanos de cadena ramificada*

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, es decir, de compuestos ricos en carbono e hidrógeno, aunque contiene otros elementos minoritarios como azufre, oxígeno y nitrógeno, así como trazas de metales. Es compleja porque dada la capacidad del átomo de carbono de formar cuatro enlaces con otros átomos de carbono, se pueden organizar como cadenas o cíclicos. Las cadenas se conocen como compuestos alifáticos, y consisten en sucesiones de átomos de carbono unidos entre sí por enlaces sencillos (alcanos), dobles (alquenos) o triples (alquinos) mientras que el resto de las valencias son ocupadas por hidrógenos. Los alcanos son la familia más numerosa en el petróleo crudo y se conocen como parafinas, pueden ser lineales o ramificados y su longitud varía de 1 a 40 carbonos, aunque se ha logrado detectar cadenas de 60 carbonos. Los compuesto cíclicos pueden ser saturados, donde varios carbonos se unen entre sí por medio de enlaces sencillos, o pueden ser aromáticos, donde algunos carbonos del anillo están unidos por enlaces dobles. Los compuestos cíclicos saturados se conocen como ciclo-alcanos, ciclo-parafinas o naftenos y son un componente minoritario del petróleo crudo. Los compuestos aromáticos son derivados del benceno, un anillo de seis carbonos unidos por tres enlaces sencillos y tres enlaces dobles alternados. Los anillos pueden encontrarse fusionados entre ellos o sustituidos con cadenas alifáticas. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) o polinúcleo aromáticos comprenden del 10 al 25% del petróleo crudo y son las fracciones más pesadas.

Como consecuencia directa del uso masivo del petróleo como fuente de energía y como materia prima, ha surgido en los últimos 50 años el fenómeno de la contaminación ambiental. Una medida que ha tenido un éxito significativo es la aplicación de técnicas de biorremediación, la cual utiliza generalmente microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas). Algunos microorganismos pueden degradar de manera natural compuestos orgánicos y esta capacidad se explota para facilitar la degradación de contaminantes y para operaciones de limpieza de desechos in situ. La biorremediación ha demostrado ser un complemento costeable y benéfico para ser usado en combinación con métodos químicos y físicos tradicionales como el composteo, la incineración y la extracción con solventes, en el tratamiento de desechos y en la descontaminación del medio ambiente.

Existe una gran variedad de microorganismos identificados en la degradación de compuestos derivados del petróleo (Tabla 26)⁽¹³⁵⁾.

Tabla 26. Microorganismos identificados en la degradación de compuestos derivados del petróleo⁽¹³⁵⁾.

| Género | Especie | Compuesto degradado |
|----------------------|-----------------------|---|
| <i>Pseudomonas</i> | spp. | Tolueno, bifenilos policlorados, Fenantreno, Petróleo crudo |
| | <i>aeruginosa</i> | Fenol |
| | <i>fluorescens</i> | Petróleo crudo |
| | <i>stutzeri</i> | Tetracloroetileno |
| | <i>putida</i> | Petróleo crudo |
| <i>Arthrobacter</i> | spp. | Hidrocarburos saturados y aromáticos |
| <i>Alcaligenes</i> | spp. | Petróleo crudo |
| | <i>faecalis</i> | Fenol |
| <i>Bacillus</i> | <i>lentus</i> | Bifenilos policlorados |
| | <i>mascerans</i> | |
| | <i>thuringiensis</i> | |
| <i>Candida</i> | <i>tropicalis</i> | Petróleo crudo |
| <i>Desulfococcus</i> | spp. | Alquilbencenos |
| <i>Mycobacterium</i> | <i>chthonoplastes</i> | n-alcanos |
| | spp. | Pireno, n-Alcanos. |
| <i>Nocardia</i> | spp. | Dibenzotiofeno |
| <i>Saccharomyces</i> | spp. | Petróleo crudo |
| <i>Serratia</i> | spp. | Fenol |
| | <i>marcescens</i> | Petróleo crudo |
| | <i>paucimobilis</i> | HPAs |
| <i>Sphingomonas</i> | spp. | Carbazol |
| <i>Xanthomonas</i> | spp. | Petróleo crudo |
| <i>Yersinia</i> | spp. | Fenol |

Aunque no han sido caracterizados en su totalidad, muchos de estos microorganismos poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación más o menos específica de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos, haciéndolos susceptibles de ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua. En algunas ocasiones no es necesario llegar a la mineralización, sino que basta una oxidación para disminuir notablemente su toxicidad o aumentar su solubilidad en agua, incrementando su biodisponibilidad⁽¹³⁵⁾.

Lo n-alcanos son fácilmente oxidados por muchos microorganismos, a través de la oxidación de un grupo metilo terminal seguida por la β -oxidación de la secuencia. Los alquil alcanos ramificados son generalmente menos susceptibles a la biodegradación, ciertos patrones de ramificación, terminaciones en tres metilos o con carbonos cuaternarios los tornan recalcitrantes causando que estos compuestos se acumulen en la biosfera. Algunas cepas de *Pseudomonas* que tienen la capacidad de degradar alcanos ramificados y alquenos, como el 3,7-dimetil-6-octen-1-ol (citronelol), este compuesto es usado como modelo de estudio para la degradación de alcanos ramificados (**Figura 59**)⁽¹³⁶⁻¹³⁸⁾.

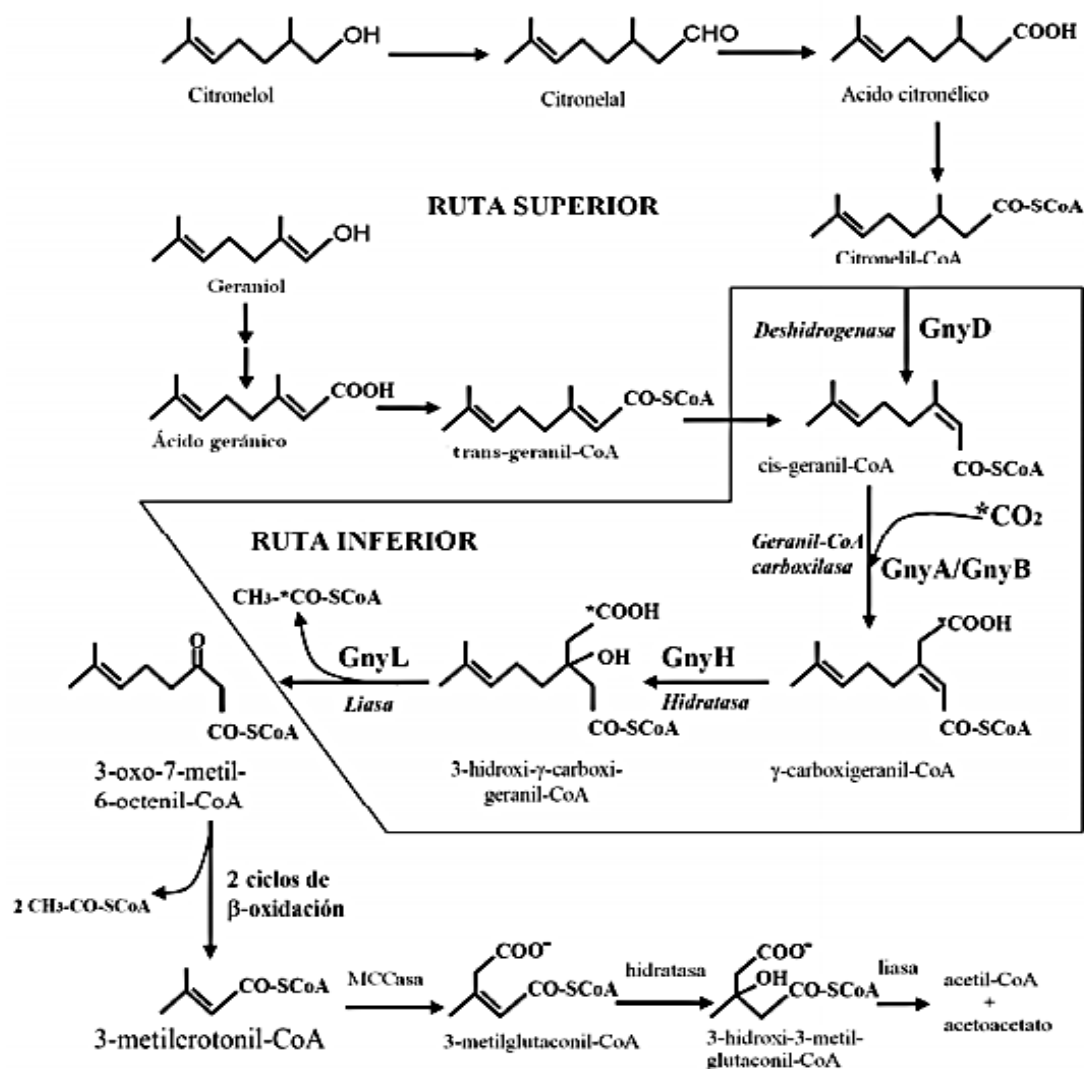


Figura 59. Ruta catabólica de Citronelol propuesta para *P. aeruginosa* PAO1; en la ruta superior se lleva a cabo

la oxidación de los alcoholes citronelol y geraniol, ambos coinciden en cis-geranil-CoA que, por las enzimas de la ruta inferior, completando su degradación hasta acetyl-CoA y acetoacetato⁽¹³⁹⁾.

El alquilbenceno de sulfonato es el tensoactivo más usado en formulaciones de detergentes domésticos. La contaminación del agua por alquilbenceno de sulfonato de cadena lineal (LAS) y de cadena ramificada (BAS) es un problema ambiental. La cepa W51D es capaz de mineralizar al menos el 70% de una mezcla comercial de BAS y degradar completamente LAS⁽¹⁴⁰⁾.

P. aeruginosa W51D es capaz de crecer en medios con sulfonatos de dodecibenceno (B-DBS) o el alcohol terpenico citronelol como única fuente de carbono, degrada el surfactante B-DBS utilizando en parte la vía citronelol, pero la mayor parte de la degradación se lleva a cabo por una nueva ruta aun no dilucidada⁽¹³⁷⁾.

Los plásmidos juegan un papel importante en la adaptación genética, se ha demostrado que en *Pseudomonas* spp. Posee plásmidos que le confieren la capacidad de metabolizar naftaleno salicilato, alcanfor, octano, xileno y tolueno⁽¹⁴¹⁾.

Las tasas de biodegradación generalmente aumentan con el incremento de la temperatura, en ecosistemas con temperaturas bajas los hidrocarburos se degradan lentamente. La degradación en ambientes acuáticos está limitado por la existencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo. Otros factores que afectan son la concentración de oxígeno, nutrientes, la humedad y el pH⁽¹⁴¹⁾.

6. CONCLUSIONES

P. aeruginosa es un patógeno oportunista de gran importancia tanto clínica como biotecnológica, capaz de colonizar ambientes inhóspitos debido a su metabolismo versátil y de bajos requerimientos nutricionales, es un bacilo Gram negativo móvil con metabolismo oxidativo de tipo respiratorio, crece en un rango de temperatura de 35-42 °C, algunas cepas presentan glicocalix.

Su potencial patógeno se debe a una combinación de múltiples factores de virulencia que incluyen componentes estructurales (Cápsula, pili, LPS, Píocianina) toxinas y enzimas (Exo A, Exo S, Exo Y, Citotoxina, Elastasa, Proteasa alcalina, Fosfolipasa C, Ramnolípidos y Neuraminidasa), cuya liberación depende de los sistemas de secreción de proteínas tipo I, II, III, V y IV de manera coordinada y contundente en tales concentraciones que permitan sobrepasar el sistema inmune del hospedador.

Es responsable de una gran gamma de infecciones en pacientes con el sistema inmune comprometido: Bacteremias, Sepsis, Infecciones del SNC, Infección de las Vías Urinarias, Infección Cutáneas y Tejidos Blandos, Infecciones Oculares, Infecciones Óseas y Articulares, Infecciones de Oído e Infecciones del Aparato Gastrointestinal. Se transmite por contacto directo, su metabolismo le permite vivir en diversos hábitats en particular ambientes húmedos. En la determinación de la relación epidemiología de los aislamientos de *P. aeruginosa*, se utilizan técnicas de biología molecular. En los estudios epidemiológicos en hospitales la determinación del fagotipo permite llegar a la definición del foco de infección

El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante métodos microbiológicos clásicos basados en pruebas bioquímicas clínicas, cuya identificación se basa en la utilización de azúcares y aminoácidos, crecimiento a diferentes pH, temperaturas, producción de pigmentos y acumulación de PHBA. Las técnicas utilizadas para su tipificación molecular son PCR y ECP, las primeras son menos laboriosas, más rápidas y más fáciles de realizar y de interpretar con respecto a las técnicas de ECP, que son menos reproducibles y discriminativas.

La adaptación evolutiva de esta bacteria se debe a su complejidad genética y al gran tamaño

de su genoma que comprende un gran número de genes que están involucrados en la regulación del catabolismo, transporte y flujo de compuestos orgánicos, así como varios sistemas de quimiotaxis. No existen clonas de *P. aeruginosa* asociadas con el desarrollo de enfermedad, la patogenicidad requiere la acción acumulativa y coordinada de algunos componentes básicos del genoma y otros localizados en islas genómicas que codifican para factores de virulencia. (PAGI). Presenta plásmidos que codifican para la resistencia a antibióticos y metales.

P. aeruginosa presenta resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos y desinfectantes cuyos mecanismos son: Aumento de la expulsión del antibiótico, Disminución de la permeabilidad de la membrana, β -Lactamasas, Mutaciones en el sitio blanco, Enzimas modificadoras de Aminoglucósidos. Disminuyendo así la cantidad de antibióticos que son activos contra este microorganismo. Es importante evitar el uso irracional de antibióticos con la finalidad de evitar el desarrollo de cepas multirresistentes, siempre que se pueda, basar el tratamiento en el resultado de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos. La aparición de cepas MDR contribuye al uso de la fagoterapia como opción terapéutica como tratamiento en infecciones por *P. aeruginosa*, aun cuando presente ciertas deficiencias: rango limitado de hospederos, pureza baja, pobre estabilidad o viabilidad de los fagos.

El proceso de Quórum sensing (QS) requiere de señales químicas, cuyo objetivo es coordinar comportamientos o acciones entre microorganismos de acuerdo a su número. *P. aeruginosa* posee 3 sistemas de señalización bacteriana: lasR-lasI, rhlR-rhlI y PQS, los cuales controlan la producción de factores de virulencia, formación del biofilm e inducen procesos inflamatorios, contribuyendo a la patogénesis y persistencia de la infección.

P. aeruginosa representa un campo potencial para nuevas líneas de investigación: Los ramnolípidos son biosurfactantes, con altos niveles de rendimiento y diversas fuentes de carbono como materia prima para su síntesis, promueven la interacción de *P. aeruginosa* con sustratos hidrófobos (n-alcanos, hexadecano y aceites) favoreciendo su asimilación. Algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de degradar compuestos derivados del petróleo: Alcanos ramificados y alquenos mediante la vía del citronelol. Los polihidroxicanoatos (PHAs), son

polímeros biodegradables producidos por *P. aeruginosa* a partir de recursos renovables, recursos fósiles y desechos residuales, son acumulados en inclusiones citoplasmáticas, se extraen con disolventes como el cloroformo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, J. S.; Morse, S. S.; Mietzner, T. A. *Microbiología Médica*. 25 ed.; McGrawHill: China, **2010**; pp. 227-229.
2. Soberón, G. *Pseudomonas aeruginosa*. UNAM. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/> (Acceso Julio 20, 2014)
3. Murray, P.; Rosenthal, K.; Pfäuer, M. *Microbiología médica*. 5 ed.; Elsevier: Madrid. **2007**; pp. 357- 363.
4. Romero, R. *Microbiología y parasitología*. 3 ed.; Panamericana: México. **2007**; pp 875-883.
5. Gómez CA, Leal AL, Pérez MJ, Navarrete ML (2005). Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Rev. Fac. Med. Unal.*, 53(1): 27-34.
6. Pumarola, A. *Microbiología y parasitología médica*. 2ed.; Salvat: Mexico. **2002**; pp. 479-485.
7. Koneman, E.; Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Procop, G.; Schreckenberger, P.; Woods, G. *Koneman diagnóstico microbiológico*. 6 ed.; Panamericana: Buenos Aires. **2008**; pp. 301-305.
8. Hugh R, Leifson E (1964). The proposed neotype strains of *Pseudomonas aeruginosa* (schroeter 1872) migula 1900. *International bulletin of bacteriological. Nomenclature and taxonomy*. 14: 69-84.
9. Ruiz, L. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su Resistencia a los antimicrobianos. PhD Thesis, Universidad de Barcelona: Barcelona, Noviembre **2007**.
10. Parama, A. Posible final de la era de los antibióticos. http://www.tendencias21.net/Posible-final-de-la-era-de-los-antibioticos_a40473.html (Acceso Junio 2, 2014).
11. Forbes, B; Sahm, D.; Weissfeld, A. *Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico*. 11 ed.; Medica Panamericana: Argentina. **2002**; pp. 400-405.

12. Cortés, M. Colonización por *Pseudomonas aeruginosa* en los enfermos sometidos a ventilación mecánica. PhD Thesis, Universidad de Barcelona: Barcelona, Diciembre **2000**.
13. Ausina, V.; Santiago, G. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 5 ed.; Médica Panamericana: Madrid. **2006**; pp. 347-356.
14. Mejía, F. Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos y ambientales de *Pseudomonas aeruginosa*. PhD Thesis Universidad de Panama: Panama, Octubre **2009**.
15. Medina, J.; Guerra, S. *Infecciones hospitalarias por bacilos Gram negativos multirresistentes: diagnóstico, tratamiento y medidas de prevención*. FEMI: Uruguay, **2012**; pp. 27-28.
16. Bacteria en fotos. *Pseudomonas aeruginosa*. <http://www.bacteriainphotos.com/pseudomonas%20aeruginosa.html> (Acceso Septiembre 2, 2014).
17. Roger, Y.; Stainer, J.; Villanueva, R. *Microbiología* .2 ed. Reverte: Madrid, **1992**; pp. 433-434.
18. Asaff, A.; Gracida, J. Aceite vegetales como fuente de carbon para síntesis de fenazinas con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388. UAM. http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_I_X/CARTEL/CIX-14.pdf (Acceso Junio 4, 2015).
19. Microkit: medios de cultivo. Cetrimide agar (base) Pharmacopea medio N Aislamiento selectivo para *Pseudomonas aeruginosa* en medicamentos (USP) y cosméticos (ISO 22717). <http://www.medioscultivo.com/cetrimide-agar-base/> (Acceso Septiembre 2, 2014).
20. Tapia, C. *Pseudomonas aeruginosa*. <http://pseudomonaeruginosa.blogspot.mx> (Acceso Septiembre 2, 2014).
21. Mallolas, J *Análisis de los factores pronósticos de la bacteriemia por "Pseudomonas aeruginosa"*. PhD Thesis. Universidad de Barcelona: España, Febrero **1990**
22. Bodey G, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 5: 279

23. .Gómez, M. Patogénesis de las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Facultad de Medicina. UBA-CONICET. http://www.aam.org.ar/descarga2.asp?Clase_Pseudomonas_aeruginosaDraMGomez.pdf (Acceso Septiembre 2, 2014).
24. Fick, R. *Pseudomonas aeruginosa the Opportunist*. 3 ed.; CRC: USA. **1993**; pp. 17.
25. Moya A, Callicó A, Cedré B (2007). Evaluación de la respuesta de anticuerpos hacia antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor*. 16(1): 1-11.
26. Rocha, R.; Lozano, P.; Martínez, Y. *Modelos de la Patogénesis de las Enfermedades Infecciosas*. Benemérita Universidad de Puebla, **2005**; pp. 111-122.
27. Hauser, A. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*. 7: 654-665
28. .Figueroa, A. Bacteriología - capítulo quince anaerobios y Pseudomonas-infecciones oportunistas. University of South Carolina. Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish/chapter15.htm> (Acceso Septiembre 13, 2014)
29. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (Acceso Septiembre 13, 2014)
30. CENAVECE. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica y Retos del siglo XXI. <http://www.himfg.edu.mx/descargas/documentos/epidemiologia/IN2013/L22abril13IN/RedHospitalariaVigilanciaEpidemiologicaRetossigloXXI.pdf>. (Acceso Junio 5, 2015).
31. Maimone, S. *Pseudomonas aeruginosa*. CODENEIP. <http://www.codeinep.org/control/pseudomonasaeruginosa.htm> (Acceso Septiembre 3, 2014).
32. Bernd, H.; Rehm, A. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. WILEY-VCH: Germany, **2008**; pp 26.
33. Martínez P, Espinal P, Máttar S (2004). Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22(6): 355-360.
34. Fernández F (2007). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Infectio*. 11(1): 6-15.

35. Fernández F, López L, Pascual A (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 31(1): 20-25
36. CDC. Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE): <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html> (Acceso Junio 5, 2015).
37. Gonzalez, F. Lección 3. Caracterización mediante marcadores moleculares-ADN. http://fernando.gonzalez.unileon.es/web_mex14/presentaciones_teoría/leccion_3.pdf (Acceso Junio 5, 2015).
38. IMSS-273-13. Prevención, Diagnóstico y tratamiento de las infecciones relacionadas a líneas vasculares. Consejo de salubridad general. http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS_273_13_INF_ECCIONLINEASVASCULARES/273GRR.pdf (Acceso Septiembre 7, 2014).
39. Longo, D.; Fauci, a.; Kasper, d.; Jameson, J.; Hauser, S.; Loscalzo, J. *Harrison principios de medicina interna*. 18 Ed.; McGraw Hill: USA, **2012**; Vol. 1 y 2, pp. 1266-1273.
40. Sandoval C, Moreno C, Abarca K, (2011). Sepsis por *Pseudomonas aeruginosa* en un lactante previamente sano. *Rev Chil Infect*. 28(6): 592-596.
41. Ferrándiz, C. *Dermatología clínica*. 3 ed. Elsevier: Barcelona, **2009**; pp 33-35.
42. Farmaconsejos. Foliculitis del jacuzzi o de los baños calientes. <http://www.farmaconsejos.com/patologias/lesiones-dermatologicas-en-el-deporte/lesiones-cutaneas-infecciosas/foliculitis-del-jacuzzi-o-de-los-banos-calientes/> (Acceso Enero 7, 2015)
43. Suárez, R. Guía dermatológica para atención primaria. Marge médica books: Barcelona. **2013**; pp 32.
44. Medicina interna. Enfermedades de las uñas. http://www.elrincondelamedicinainterna.com/2013_02_24_archive.html (Acceso Enero 7, 2015)
45. IMSS-624-13. Prevención, Diagnóstico y de la Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica. CENETEC. http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS_624_13_NEU_M_VENTIL_MECANICA/624GER.pdf (Acceso Septiembre 7, 2014).

46. IMSS-627-13. Diagnóstico de fibrosis quística en la edad pediátrica. CENETEC.
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS_627_13_FIBROSISQUISTICAPEDIATRICA/627GRR.pdf (Acceso Septiembre 7, 2014).
47. Spectrum. Contact Lens Sprectrum. Should You Use Corticosteroids to Treat Bacterial Keratitis? <http://www.clspectrum.com/articleviewer.aspx?articleID=105077> (Acceso Enero 7, 2015)
48. Hernández S, Bejar F (2015). Endoftalmitis bilateral por *Pseudomonas aeruginosa* secundaria a cirugía de catarata simultánea. Reporte de caso. *Rev. Mex. Oftalmología*. 89(2): 34-42
49. IMSS-438-11. Diagnóstico y tratamiento de la otitis externa aguda en adultos. CENETEC.
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/ISSSTE_638_13_OTITISMEDIA/ISSSTE_638_13_OTITISMEDIA_RR.pdf (Acceso Septiembre 7, 2014)
50. Offline Clinic. Acute Otitis Externa (Swimmers Ear). <http://offlineclinic.com/acute-otitis-externa-swimmers-ear/471/> (Acceso Enero 7, 2015).
51. Patigaroo S, Mehfooz N, Hashmi S (2009) Malignant otitis externa with ecthyma gangrenosum and pneumonia in an infant. *SAMJ, S. Afr. Med. J.* 99(10): 1-15.
52. IMSS-638-13. Diagnóstico y tratamiento de las complicaciones intratemporales de otitis media aguda en pacientes pediátricos y adultos en segundo y tercer nivel de atención. CENETEC.
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/443_GPC_Otitis_externa_aguda/GER_Otitis_externa_aguda.pdf. (Acceso Septiembre 7, 2014).
53. Chase, K. Mastoiditis in Emergence Medicine. Medscape.
<http://misc.medscape.com/pi/android/medscapeapp/html/A784176-business.html> (Acceso Enero 7, 2015).
54. IMSS-027-08. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección de vías urinarias no complicada en menores de 18 años en el primer y segundo niveles de atención. CENETEC.
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/027_GPC_IVUenPediatría/SS_027_08_EyR.pdf (Acceso Septiembre 7, 2014)
55. IMSS-649-14. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones asociadas a dispositivos ortopédicos y/o material de osteosíntesis. CENETEC.

- <http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS-649-14-Infeccionesdispositivosortopedicos/649GRR.pdf> (Acceso Septiembre 7, 2014)
56. IMSS-310-10. Diagnóstico, tratamiento y prevención de las meningitis aguda bacteriana adquirida en la comunidad en pacientes adultos inmunocompetentes. CENETEC. http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/310_GPC_Diagnostico_tratamiento_MENINGITIS_AGUDA_BACTERIANA/RER_Diagnostico_y_tratamiento_de_MENINGITIS_AGUDA_BACTERIANA.pdf (Septiembre 7, 2014)
57. Cercenado, E.; Cantón, R. *Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos*. SEIMC: España. **2006**.
58. BIOMÉRIEUX. Su aliado en medios de cultivo. http://www.biomerieux.com.mx/upload/CATALOGO_DE_PLACAS11.pdf (Acceso Octubre 24, 2014).
59. BIOMÉRIEUX. Productos chromID. [.http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?open=ARG_CLN_PRD&doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_58&pubparams.sform=9&lang=es_a](http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?open=ARG_CLN_PRD&doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_58&pubparams.sform=9&lang=es_a) (Acceso Octubre 24, 2014).
60. BIOMÉRIEUX. API 20NE <http://www2.fiu.edu/~makemson/MCB3020Lab/API20neInstructions.pdf> (Acceso Octubre 24, 2014).
61. Callicó A, Cedré B, Sifontes S, Torres V, Pino Y, Callís A, Esnard S (2004). Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor*. 13(3): 1-12.
62. Barrow, G.; Feltham, R. Cowan and Steel's Manual for the identification of Medical Bacteria. 3ª Ed. USA: Cambridge University press; 2003; pp 98.
63. Esnard S, Diaz O (1997). Identificación y caracterización de bacilos Gram negativos aislados en medio hospitalario. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 35(1): 30-37.
64. Shayegani, M.; May, A.; MacGlynn, D. (1978) Evaluación of the Oxi/Ferm tube System for identification Gram-Negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol*. 7(6): 533-538
65. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406: 959-964.

66. Morales R, Soberón G, Delgado G, Sandner L, Méndez JL, González G, (2012) Genetic and Phenotypic Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Population with High Frequency of Genomic Islands. *PLoS ONE*. 7(5): 354-359
67. Brown, T. *Genomas*. Panamericana: Argentina, 2007; pp. 234-237.
68. Winsor, G.L.; Lam, D.K.; Fleming, L.; Lo, R.; Whiteside, M.D.; Yu, N.Y.; Hancock, R.E.; Brinkman, F.S.; *Pseudomonas* genome database. Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics. <http://www.pseudomonas.com/> (Acceso Agosto 20, 2014)
69. Römling U, Schmidt KD, Tummeler B (1997) Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J. Mol. Biol.* 271: 386-404.
70. He J, Baldini R, Deziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati N, Lee D, Urbach J, Goodman H, Rahme L (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *PNAS*. 101(8): 2530-2535.
71. Lee D, Urbach M, Wu G, Liberati N, Feinbaum N, Miyata S, Diggins T, He J, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery G, Kucherlapati R, Rahme L, Ausubel F. (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology*. 7(10): R90.
72. Koreen, M. *Characterisation of pathogenicity islands in vivo and in vitro and the in vivo virulence of Pseudomonas aeruginosa*. PhD Tesis. University of Leicester; Febrero, **2009**.
73. Curtis, H.; Schnek, A. Curtis. *Biología*. 7 ed.; Panamericana: Argentina. **2008**; pp. 249-253.
74. Raja C, Selvam GS (2009). Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* as metal resistant. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 6(2):259-266.
75. Jafari E, Reza M, Poormasoomi L (2013). Isolation of a Novel Antibiotic Resistance Plasmid DNA from Hospital Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin Exp Pathol.* 3(2): 140.
76. Merino, S. Mecanismos moleculares de la patogenicidad de "*Aeromonas hydrophila*". Universidad de Barcelona. <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42406> (Acceso 11 de septiembre 2014).

77. Piédrola-Angulo, G. *Microbiología y parasitología médica*. Masson: Barcelona. **1987**; pp. 80.
78. Davidson, J.; Adams R. L. *Bioquímica de los ácidos nucleicos de Davidson*. Reverte: España, **1980**.
79. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, Balloy V, Touqui L (2010). Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *JID*. 201:1096-1104.
80. Shors, T. *Virus estudio molecular con orientación clínica*. Médica Panamericana: Argentina, **2009**; pp. 1096-1104:
81. Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin J, Lehman S, Donlan R (2010). Bacteriophage Cocktail for the Prevention of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* on Catheters in an In Vitro Model System. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 54(1): 2064-2075.
82. Phee, A. *Efficacy of Bacteriophage Treatment on Pseudomonas aeruginosa Biofilms*. PhD Thesis, University of Toronto: Canada. Junio, **2012**.
83. Shukho K, Rahman M, Seol S, Yoon S, Kim J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage PA1Ø Requires Type IV Pili for Infection and Shows Broad Bactericidal and Biofilm Removal Activities. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(17): 6380-6385.
84. Postic B, Finland M (1961). Observations on bacteriophage typiying of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jci*. [en línea] 1961; 397-404.
85. Pitt TL (1981). A comparison of flagelar typing and phage typing as means of subdividing the O groups of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol*. 14: 261-270.
86. Bernstein R, Mushin R, Rabinowitz K. (1972). Typing of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of the phage procedure with the pyocine technique. *J. Hyg., camb*. 71:403-410.
87. Meletis, G.; Bagkeri, M. *Pseudomonas aeruginosa: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options*. Intech: USA. **2013**; pp. 34-45.
88. Moreno, L; Lizasoain, L.; Sánchez, M.; Pérez, P.; Lorenzo, P. *Velázquez Farmacología Básica y Clínica*. Panamericana: China, **2008**; pp. 808.812.

89. Suárez CJ, Kattán JN, Guzmán AM, Villegas MV (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, Acinetobacter y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control. *Infect.* 10(2): 1-7.
90. Lister P, Wolter D, Hanson N (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(4): 582-487.
91. Nicolau C, Oliver A (2010). Carbapenemasas en especies del género Pseudomonas. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin.* 28(1): 19-28.
92. Poole K (2013). Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49(2): 479-487.
93. Cabrera CE, Gómez RF, Zúñiga AE (2007) La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb. Med.* 38(2): 1-13.
94. Owlia P, Nosrati R, Alaghenbandan R, Rastegar A (2014). Antimicrobial susceptibility differences among mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *GMS Hygiene and Infection Control.* 9 (2): 9-13
95. CDC. *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. <http://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html> (Acceso Octubre 7, 2014)
96. Muñoz, A.; Duarte, C. Manual de procedimientos para la determinación de susceptibilidad antibiótica en patógenos de importancia hospitalaria. Instituto Nacional de Salud. <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-inter%C3%A9s-en-salud-publica/Microbiologa/MANUAL%20DE%20PROCEDIMIENTOS%20%20DETERMINACION%20SUSCEPTIBILIDAD%20PATOGENOS%20IMPACTO%20HOSPITALARIO.pdf> (Acceso Octubre 7, 2014).
97. Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. *Introducción a la microbiología*, 9 Ed.; Panamericana: Argentina, **2007**; pp. 57.
98. Jiménez P, Pozuelo MJ, Linares F, García JE (2007). Quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and Salmonella: Active natural compounds as antagonists. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* 39: 41-51.

99. Pesci EC, Milbank JB, Pearson J, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP; Iglewski BH (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. 96: 11229-11234.
100. Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G, Rahmel LG (2011). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *ISME Journal*. 5: 1332–1343.
101. Parsek MR, Greenberg EP (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *PNAS*. 97(16): 8789-8793.
102. Salcedo, A.; García, M. D. *Fibrosis quística*. Díaz de santos: Madrid. **1998**; pp. 64-65.
103. Seshadri, S. *Plant Extracts Against Pseudomonas aeruginosa - in Vitro & in Vivo Studies*. Grin: Germany, **2011**; pp. 11.
104. Ramsey DM, Wozniak DJ (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular Microbiology*. 56(2): 309–322.
105. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J (2000). High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science*. 288(5469): 1251-1253.
106. Prakash B, Veeregowda BM, Krishnappa G (2003). Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Current Science*. 85(9): 1299-1307.
107. Nazar J. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev, Otorrinolaringol. Cir Cabeza cuello*. 67(16): 61-72.
108. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998). The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science*. 280(16): 295-298.
109. Davey, M. E.; O’toole, G. A (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol.* 64(16): 847-867.
110. O’Toole GA, Kolter R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Microbiology*. 30(2): 295-304.

- 111.Rehm, B. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. Wiley-VCH: Germany, **2008**; pp. 16-19.
- 112.Semmler A, Whitchurch CB, Mattick JS (1999). A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 145: 2863–2873.
- 113.Filloux A (2011). Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front Microbiol*. 2(155): 1-21.
- 114.González, B.; Dreyfus, G. *Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia*. UNAM: México, **2003**.
- 115.Yañez G, Wong A (2013). Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. *Biotecnología*. 17(13): 23-27.
- 116.Olivera, N. Biosurfactantes de origen microbiano y sus aplicaciones Tecnológicas. CENPAT. http://www.cenpat.edu.ar/pop_up03_temas08a.html (Acceso Octubre 16, 2014).
- 117.Sulbarán M, Bahsas A, Velásquez W, Otoniel J (2005) Caracterización de Biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* Fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado. *Ciencia*. 13(2) 1-12
- 118.Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF (2001).Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering geology*. 60: 371-380.
- 119.Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2002). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol. Biotechnol*. 87: 427-444.
- 120.Sen, R. *Biosurfactants*. Springer: Texas., 2010; pp. 42-52.
- 121.Soberón G, Lépine F, Déziel E (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol*. 68:718-725.
- 122.Soberón, G. *Biosurfactants*. Springer-Verlag: Berlin. **2001**; pp. 14-43.
- 123.Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. *Journal of bacteriology*. 92: 5756–5767.

124. Ochsner UA, Reiser J (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6424-6428.
125. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 87: 427-444.
126. Vatsa P, Sanchez L, Clement C, Baillieul F, Dorey S (2010). Rhamnolipids biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *Int. J. Mol. Sci.* 74(6): 3134-3147.
127. Zulianello L, Carnard C, Köhler T, Caille D, Lacroix JS, Meda P (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity.* 11: 5095-5108
128. Glick R, Gilmour C, Tremblay J, Satanower S, Avidan O, Deziel E, Greenberg EP, Poole K, Banin E (1997). Increase in rhamnolipid synthesis under Iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology.* 92: 5756–5767.
129. Ojumu TV, Yu J, Solomon BO (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology.* 3: 18-24.
130. Reddy CSK, Ghai R, Rashmi R., Kalia VC (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology.* 87(2): 137–146.
131. Fernández D, Rodríguez E, Bassas M, Viñas M, Solonas AM, Llorens J, Marqués AM, Manresa A (2005). Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain k NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering.* 26: 159–167.
132. Pham TH, Webb JS, Rehm B (2004). The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology.* 150: 3405–3411.
133. Cardona AC, Mora AL, Marín M (2013). Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.* 66(2): 7129-7140.

134. Pantazaki A, Papaneophytou C, Lambropoulou D (2011). Simultaneous polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids production by *Thermus thermophilus*. *AMB Express*. 1(17): 1–13.
135. Valderrama, B. Microbiología del petróleo y sus derivados. UNAM; 2001. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap2/> (Acceso Diciembre 2, 2014).
136. Schaeffer TL, Cantwell SG, Brown JL, Watt DS, Fall RR (1979) Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38; 742-746.
137. Campos J, Esteve A, Vázquez-R, Ramos JL, Soberón G (1999). Branched-chain dodecylbenzene sulfonate degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D involves a novel route for degradation of the surfactant lateral alkyl chain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3730-3734.
138. Campos J, Soberón G (2000). Degradation of the methyl substituted alkene, citronellol, by *Pseudomonas aeruginosa*, wild type and mutant strains. *Biotechnol. Letters*. 22: 235-237.
139. Aguilar, J. Caracterización de geranyl-CoA y 3-metilcristonil-CoA carboxilasas de *Pseudomonas aeruginosa* involucradas en la degradación de leucina e isoprenoines acíclicos. PhD Thesis, UMSNH. Michoacan. Marzo **2008**.
140. Soberón G, Haïdour A, Ramos JL., Campos J, Ortigoza J (1996). Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing some isomers in a branched-chain dodecylbenzene sulfonate mixture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 367-372
141. Leahy JG; Colwell RR (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*. 54: 305-315.
142. Olaitan A, Morand S, Rolain J (2014) Mechanisms of polymixin Resistance: acquired and intrinsic Resistance in bacteria. *Frontier in Microbiology*. 5: 1-18. [Acceso 16 de junio del 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244539/pdf/fmicb-05-00643.pdf>

143. Secretaria de Salud. RHOVE Informe Anual 2014.
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/inf_rhove/infoanual_rhove_2014.pdf (Acceso Junio 16 del 2015).