



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

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR AISLADOS DE *Stenotrophomonas maltophilia* PROVENIENTES DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EN UNIDADES DE CUIDADO CRÍTICO
(Modalidad: Tesis de Grado)

SAMIA SAPPHIRO SMALL BERMÚDEZ

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

CUMANÁ, 2012

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR AISLADOS DE *Stenotrophomonas maltophilia* PROVENIENTES DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EN UNIDADES DE CUIDADO CRÍTICO

APROBADO POR:



MSc. Dina Antón
Asesora



ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Muestras	8
Viabilidad de la muestra.....	8
Determinación de biopelículas sobre superficies de diferentes materiales.....	8
Preparación de inóculos (Passerini <i>et al.</i> , 2007).	8
Método en láminas de vidrio (Passerini <i>et al.</i> , 2007).....	8
Método en tubos de ensayo (O'Toole <i>et al.</i> , 1999).	9
Método en microplacas de titulación (Passerini <i>et al.</i> , 2007).	9
Método en catéteres (Joyanes <i>et al.</i> , 2000).	10
Determinación de la presencia de exopolisacáridos para la formación de.....	10
Determinación de la expresión del potencial de supervivencia	11
Método de sensibilidad al estrés oxidativo (Hassett <i>et al.</i> , 1999).	11
Análisis estadístico.....	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
CONCLUSIONES	23
RECOMENDACIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	25
APÉNDICES.....	31

HOJA DE METADATOS 36

DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso y a Santa Barbará bendita por guiarme, protegerme, bendecirme e iluminarme en cada uno de los días de mi vida, dándome la fortaleza necesaria para lograr la culminación de este gran sueño.

Mi adorada madre Tamara, quien ha sido madre y padre a la vez, me has dado todo, la vida, un amor incondicional que no tiene límite, apoyo y lo más importante has sido mi ejemplo de fortaleza y temple ante la vida, me has dado todo lo necesario para existir. Que Dios te bendiga y te proteja siempre, te amo.

Mis adorados abuelos Antonio José que ya está junto a Dios descansado en paz, te extraño mucho y Migdalia, por ser mis segundos padres e inculcarme valores y principios, por llenarme de amor y consentirme, por apoyarme durante cada etapa de mi vida y por estar siempre junto a mí; espero que con este logro se sientan muy orgullosos de mí. Los amo.

Mis queridos hermanos Miguel Ángel y Antonio José, por su amor y por creer siempre en mí, por sus experiencias y para que crean en que la constancia, la perseverancia y el respeto son los caminos que conducen al éxito.

Mi amado Francisco, por haber llegado a mi vida, por tu amor incondicional, por estar a mi lado y apoyarme en las buenas y en las malas, gracias por ser mi ejemplo de constancia y perseverancia en la vida, gracias por tu apoyo, comprensión y sabiduría en cada instante, sin ti no lo hubiera logrado. Te amo mucho.

Mis tías y tíos, primos y demás familiares que siempre han estado pendiente de mi deseándome todas las cosas bonitas de la vida en especial a mi prima ahijada Gabriela de los Ángeles, por todo tu amor y cariño.

Mi preciosa perrita kitty, por todas las alegrías que me has dado y por estar conmigo siempre acompañándome y dándome ánimos sin necesidad de palabras.

A todos muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A

La MSc. Dina Antón, por su dedicación y paciencia, por brindarme su amistad y comprensión, por su valiosa y generosa asesoría, por compartir sus conocimientos conmigo y por aceptar el reto de dirigir, desarrollar y llevar a cabo la culminación de este trabajo de investigación.

El profesor William Velásquez, por su valiosa colaboración y desinteresada ayuda.

Mis amigos Johanna León, Virginia Vásquez, María V. Figuera, Ángel Álvarez, Olimar Marchan y Aura Nazaret, por los gratos momentos que compartimos para lograr la culminación de nuestras tesis.

Todas las personas que aportaron sus conocimientos en la realización de este trabajo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de Kruskal Wallis para las lecturas cuantitativas de las diferentes técnicas aplicadas para la formación de biopelículas en <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	17
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formación de biopelículas por aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en laminillas de vidrio.	12
Figura 2. Biopelículas formadas por aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> sobre laminillas de vidrio. A) Agregación fuerte. B) Agregación moderada.	13
Figura 3. Formación de biopelículas por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> sobre tubos de borosilicato.	14
Figura 4. Formación de biopelículas por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> sobre tubos de polipropileno.	14
Figura 5. Relación entre la biomasa celular y la formación de biopelículas en cepas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	15
Figura 6. Biopelículas formadas por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en catéteres de silicona y policloruro de vinilo.	17
Figura 7. Variación de los métodos utilizados para la lectura de biopelículas en <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18
Figura 8. Producción de exopolisacáridos por el método de rojo Congo en cepas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . A) Colonias blancas productoras de exopolisacáridos cepa Sm18, B) Colonias rojas no productoras de exopolisacáridos cepa Sm13.	19
Figura 9. Capacidad de supervivencia de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ante la exposición con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂). A) cepa 18 resistente. B) cepa 11 resistencia intermedia.	21

RESUMEN

Se evaluó la formación de biopelículas en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* asociadas a infecciones intrahospitalarias, sobre diferentes superficies y su capacidad de supervivencia al estrés oxidativo. 18 cepas de *S. maltophilia* fueron ensayadas, se les determinó la capacidad de formar biopelículas sobre laminillas de vidrio de borosilicato, tubos de borosilicato (BS) y polipropileno (PP), microplacas de poliestireno (PS), catéteres de policloruro de vinilo (PCV) y silicona, y se evidenció la producción de exopolisacáridos a través del método de rojo Congo, el potencial de supervivencia se determinó mediante el método de sensibilidad al estrés oxidativo con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 12%. Todas las cepas fueron formadoras de biopelículas sobre los materiales empleados. En laminillas de vidrio se observó que 14 (77,8%) formaron biopelículas fuertes y 4 (22,2%) biopelículas moderadas. En tubos de BS 9 (50,0%) fueron productores fuertes, 7 (38,9%) productores moderados y 2 (11,1%) productores débiles de biopelículas. Mientras que en tubos de PP se observó que 15 (83,3%) producían biopelículas fuertes y 3 (16,7%) biopelículas moderadas. En microplacas de PS y catéteres de PCV, todas las cepas (100,0%) formaron biopelículas fuertes mientras que en catéteres de silicona, 4(22,2%) fueron productores fuertes, 7(38,9%) productores moderados y 7 (38,9%) fueron productores débiles de biopelículas. Al comparar los métodos cuantitativos, se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) entre las técnicas de microplaca de PS, tubos de BS y tubos de PP, donde la técnica de microplaca de PS resulto ser más efectiva y recomendable para ser aplicada como una herramienta cuantitativa confiable para la formación de biopelículas. De las 18 cepas en estudio, 14 cepas (77,8%) resultaron ser productoras de exopolisacáridos, mostrando colonias de color blanco y 4(22,2%) fueron no productoras presentando colonias de color rojo. En cuanto a la capacidad de la bacteria de sobrevivir al H_2O_2 al 12%, 16 cepas (84,6%) resultaron sensibles, 1 (7,7%) intermedia y 1 (7,7%) resistente a la acción del peróxido. La técnica de microplaca de PS demostró ser de gran precisión evidenciando la formación de biopelículas por *S. maltophilia*. Debido a que este microorganismo posee carga superficial positiva a pH fisiológico, favorece su adherencia a materiales con carga negativa como PCV y silicona, comúnmente utilizados en la fabricación de implementos médicos, facilitando procesos de infección/colonización asociados al uso de técnicas invasivas, como cateterismo, intubación y traqueotomía. *S. maltophilia* fue sensible al estrés oxidativo con H_2O_2 al 12%, no sobreviviendo en su mayoría al efecto biocida del peróxido de hidrógeno.

Palabra y/o Frases Claves: Biopelículas, *Stenotrophomonas maltophilia*, Exopolisacáridos, Estrés oxidativo.

INTRODUCCIÓN

Las biopelículas son comunidades microbianas complejas, inmersas en una matriz de exopolisacáridos y adheridas a una superficie viva o inerte. En la naturaleza, constituyen un modo de crecimiento protegido que permite la supervivencia de los microorganismos en un medio hostil (Costerton *et al.*, 1999). Se componen de agua en un 97% del contenido total. Además de agua y células bacterianas, la matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente, por exopolisacáridos y en menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y otros productos procedentes de la lisis de las bacterias (Sutherland, 2001; Branda *et al.*, 2005).

La estructura de las biopelículas presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno, incluso hasta las zonas más profundas de la biopelícula. Lo que genera diferentes microambientes en cuanto a concentración de nutrientes, pH u oxígeno se refiere. La heterogeneidad de los microorganismos que integran las biopelículas dificulta su erradicación de los ambientes donde se establecen (Costerton, 1995; Davey y O'Toole, 2000; Stoodley *et al.*, 2002). Cuando los microorganismos se desprenden de las biopelículas, pueden desplazarse y adherirse a nuevas superficies colonizándolas, manteniendo las mismas características que tenían en la biopelícula de donde proceden (Watnik y Kolter, 2000).

Los microorganismos que se encuentran en las biopelículas, tienen la capacidad de interactuar unos con otros, lo que se ha denominado comunicación celular, esta característica de las biopelículas, involucra la regulación y expresión de genes a través de la acumulación de moléculas de señalización. Esta acumulación de señales químicas depende de la densidad bacteriana y median la comunicación intracelular. Simultáneamente, los microorganismos pueden producir sustancias para estimular la propagación de colonias e inhibir el crecimiento de otras, quedando los

microorganismos patógenos en una posición favorable dentro de las biopelículas (Costerton *et al.*, 1995). Las biopelículas se pueden desarrollar por medio de dos tipos de procesos; a partir de una célula planctónica o de otra biopelícula (Socransky y Haffajee, 2003).

La capacidad que poseen los microorganismos de interactuar entre sí, influye en la producción de factores de virulencia, en la estructura de la propia biopelícula y en la resistencia ante las defensas del hospedero y antimicrobianos. Esto atribuido a que, los anticuerpos y los antimicrobianos no tienen acceso a los microorganismos patógenos debido al lugar que éstos ocupan en las biopelículas (Stewart y Costerton, 2001). Existen evidencias indicando que, las bacterias organizadas bajo la estructura de biopelículas son 500 veces más resistentes a los antibióticos (Costerton, 1995; Costerton *et al.*, 1999).

Los avances en la medicina han permitido la aplicación de dispositivos médicos en el organismo, como implantes de válvulas cardíacas, catéteres de línea central, intravenosos y urinarios que no causan reacciones adversas, pero que generan ambientes óptimos para la formación de biopelículas, de esta manera, muchas infecciones bacterianas persistentes o crónicas pueden ser explicadas por la presencia de biopelículas (Donlan, 2001; Kim, 2001).

Estudios recientes indican que más del 60% de las infecciones intrahospitalarias son causadas por microorganismos que forman biopelículas, prolongando la hospitalización e incrementando los costos de atención y la mortalidad. Las bacterias formadoras de biopelículas causan múltiples infecciones, a nivel del tracto urinario son causadas por *Escherichia coli* y otros patógenos, infecciones de oído medio por *Haemophilus influenzae*, la formación de placa bacteriana, la gingivitis y la periodontitis son la causa de biopelículas formadas por *Streptococcus* sp.,

Fusobacterium sp., y *Porphyromona* sp., las infecciones intrahospitalarias, principalmente, las respiratorias como neumonías asociadas a ventilación mecánica y pacientes con fibrosis quística, son causadas por *Stenotrophomonas maltophilia* (Cercenado, 2006; Corzo y Gómez, 2006; Del Toro *et al.*, 2006).

Taxonómicamente, *S. maltophilia* era conocida anteriormente como *Pseudomonas maltophilia* (Hugh y Ryschenkow 1961) y *Xanthomonas maltophila* (Swings *et al.*, 1983), hasta que Palleroni y Bradbury (1993) propusieron la creación de un nuevo género denominado *Stenotrophomonas*, siendo *S. maltophilia* el único miembro, dentro del grupo V de ARNr de la familia *Pseudomonaceae*. Posteriormente (Nesme *et al.*, 1995), confirmaron la distinción entre *S. maltophilia* y los miembros del género *Xanthomonas* mediante el uso de mapeos de restricción de genes 16S ARNr amplificados por PCR. Actualmente es aceptada la designación de *Stenotrophomonas*.

S. maltophilia pertenece al grupo de los bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa (BGNNF), aerobio estricto, no esporulado. Las bacterias de este género se definen como bacilos Gram negativos rectos y en ocasiones ligeramente curvos, con una longitud de 0,5 a 1,5 μm . Generalmente, se encuentran solos o en pares y es móvil por presentar un mechón de flagelos en uno de sus polos (Juliet *et al.*, 2006).

En cuanto a su hábitat, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (Denton *et al.*, 1998). En el medio ambiente, ha sido aislada en aguas residuales, lagos y ríos, en el suelo, en la rizosfera de diferentes vegetales, en animales y en alimentos (Hugh y Gilardi, 1980; Papapetropoulou *et al.*, 1994). En el medio hospitalario, se aísla del agua procedente de respiraderos y grifos, en descontaminantes preoperatorios, tubos con etilendiaminotetracético (EDTA),

catéteres de succión traqueal y bombas auxiliares cardiopulmonares, y en ocasiones en las manos del personal sanitario (Villarino *et al.*, 1992; Denton *et al.*, 1998; Sevillano *et al.*, 2001).

S. maltophilia es un patógeno oportunista cuya incidencia de aparición intrahospitalaria se ha incrementado en la actualidad, por lo que se considera como un patógeno de creciente importancia, especialmente, en pacientes con factores de riesgo intrínsecos asociados con inmunodepresión (Julve *et al.*, 1998) y extrínsecos asociados al uso de catéteres vasculares, ventilación asistida, hospitalización prolongada, estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y principalmente, la exposición previa a antibiòticoterapia de amplio espectro (Nicodemo y Páez, 2007). La vía de entrada de *S. maltophilia* al organismo frecuentemente es desconocida, la hospitalización prolongada y la antibiòticoterapia de amplio espectro pueden favorecer que este microorganismo se localice en la vía respiratoria o gastrointestinal de los pacientes (Denton *et al.*, 1998; Berg *et al.*, 1999; Valdezate *et al.*, 2004).

Aunque este microorganismo fue considerado por mucho tiempo como una bacteria de patogenicidad limitada, las infecciones por *S. maltophilia* representan un gran problema, debido a su natural multirresistencia asociada a un aumento de morbimortalidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, encontrándose entre los primeros 3 gérmenes aislados con mayor frecuencia (Denton y Kerr, 1998; Senol, 2004; Antón *et al.*, 2005).

La resistencia múltiple de *S. maltophilia*, se asocia a diversos factores, como son la permeabilidad disminuida que impide la entrada de antimicrobianos, la presencia de bombas intermembranales que impulsan hacia afuera a los antibiòticos impidiendo que concentraciones adecuadas ingresen en el interior de la bacteria,

además de la producción de enzimas hidrolíticas o inactivantes como betalactamasas que hacen que los betalactámicos carezcan de actividad (Jennie *et al.*, 2003; McGowan, 2006).

Las bacterias del género *Stenotrophomonas* poseen una carga superficial positiva a pH fisiológico, lo cual favorece su adherencia a materiales con carga negativa como el teflón y el vidrio. De la misma forma, es capaz de adherirse a distintos tipos de plásticos como cánulas intravasculares y tubos endo-traqueales, facilitando procesos de infección/colonización asociados al uso de técnicas de cateterismo, intubación y traqueotomía (Jucker *et al.*, 1996; Mooney *et al.*, 2001), ésta sería una importante propiedad de la bacteria puesto que el material empleado en las técnicas invasivas, anteriormente referidas, ha sido descrito como una importante fuente de transmisión intrahospitalaria, tanto en cepas de origen clínico como de origen ambiental (Villarino *et al.*, 1992; Denton *et al.*, 1998; Senol, 2004).

La ávida adhesión que presenta *S. maltophilia* a implantes médicos y catéteres se debe a la formación de una biopelícula que le proporciona inmunidad natural contra los diferentes agentes antimicrobianos y las defensas del sistema inmune (Denton y Kerr, 1998; Crispino *et al.*, 2002; Antón *et al.*, 2005). La adhesión a las células epiteliales y la naturaleza de los factores de la superficie bacteriana, determinan la formación de biopelículas sobre superficies vivas o inertes. *Stenotrophomonas maltophilia*, presenta estructuras denominadas fimbrias producidas durante su crecimiento a 35°C. Estas fimbrias actúan como puentes entre la bacteria y las superficies a las que se adhiere (superficies inertes o células epiteliales); participando en procesos de formación de biopelículas, hemaglutinación y adherencia a cultivos de células de mamíferos (Oliveira *et al.*, 2003).

Un mecanismo de defensa del organismo comúnmente encontrado por las bacterias es el estrés oxidativo, en el que se generan pequeñas cantidades de especies

reactivas de oxígeno (ERO), producidas por células fagocíticas para combatir las infecciones bacterianas incluyendo radicales hidroxilo (OH^\cdot), aniones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Aunque el uso de estos compuestos altamente reactivos en la respuesta citotóxicas de los fagocitos causa daños a los tejidos huésped, la no especificidad de estos oxidantes es una ventaja, ya que pueden dañar casi cualquier parte de la célula blanco. Esto impide que un agente patógeno escape de esta parte de la respuesta inmunitaria mediante la mutación de un único blanco molecular (Rice y Gopinathan, 1995).

Muchos microorganismos poseen enzimas que ofrecen protección frente a productos tóxicos del O_2 . Los aerobios obligados y anaerobios facultativos contienen normalmente las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, que catalizan la destrucción de los radicales superóxido y H_2O_2 , respectivamente. La peroxidasa también puede ser utilizada para eliminar el H_2O_2 (Prescott *et al.*, 2004).

La resistencia de las bacterias a múltiples sustancias hoy día es un problema de salud pública que se viene observando a nivel mundial, después de la aparición de los antibióticos. El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir con eficacia la acción bactericida de alguno de estos agentes químicos (Cabrera *et al.*, 2007).

El H_2O_2 (agua oxigenada), se utiliza frecuentemente en la desinfección, esterilización, antisepsia, irrigación de heridas y en su taponamiento húmedo. Generalmente se utiliza como antiséptico en combinación con el bicarbonato. Tiene una acción oxidante a nivel de membrana a través de la formación de radicales libres. Es considerado eficaz contra hongos, virus, esporas y bacterias Gram positivas. Presenta la ventaja de que el oxígeno liberado del catabolismo es tóxico para las

bacterias y ayuda a eliminar detritus celulares y tejidos desvitalizados que favorecen la infección. Sin embargo algunas bacterias son resistentes por la posesión de catalasas y peroxidasas (Muñoz *et al.*, 2010).

Actualmente, se ha cambiado la idea de que las bacterias se encuentran en el medio ambiente en una forma unicelular o planctónica, como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría se encuentran principalmente formando biopelículas, la capacidad de *S. maltophilia* a adherirse ávidamente a las superficies de plástico y formar biopelículas, son factores que favorecen la contaminación de implementos médicos por parte de estas bacterias afectando tanto al medio ambiente como al área de la salud, ya que los tratamientos antimicrobianos empleados habitualmente para su eliminación no resultan eficaces debido al lugar que ocupan los microorganismos dentro de las biopelículas; por estas razones, el presente trabajo tuvo como finalidad detectar la capacidad de formar biopelículas de cepas de *S. maltophilia* sobre superficies de diferentes materiales de vidrio y plástico, y la expresión del potencial de supervivencia que éstas presentan.

METODOLOGÍA

Muestras

Para este estudio, se procesaron 18 cepas de *S. maltophilia*, aisladas de pacientes hospitalizados de la unidad de cuidados críticos del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, las cuales se encontraban preservadas a temperatura ambiente en medios de agar conservación. Éstas fueron suministradas por el Laboratorio de Investigación Bacteriológica del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Viabilidad de la muestra

Las cepas fueron reactivadas en caldo tripticasa de soya (CTS) y posteriormente, se sembraron en agar tripticasa de soya (ATS), agar sangre (AS) y agar Mac Conkey (MCK), para verificar su pureza y viabilidad.

Determinación de biopelículas sobre superficies de diferentes materiales

Preparación de inóculos (Passerini *et al.*, 2007).

A partir de las colonias viables en ATS, se inocularon en CTS y se dejaron crecer por 24 h a 35°C. Posteriormente, se realizaron diluciones en tubos con 1ml de CTS para estandarizar los inóculos hasta contener entre 5×10^7 y 1×10^8 células/ml, leídos a una densidad óptica (DO) con longitud de onda de 546 nm. Se realizaron diluciones de 1:100 en CTS para los ensayos posteriores.

Método en láminas de vidrio (Passerini *et al.*, 2007).

Para este ensayo se utilizaron laminillas de vidrio de borosilicato (BS) estériles, las cuales se colocaron asépticamente en placas de Petri, junto con 15 ml de la

dilución 1:100 de los inóculos estandarizados que se encontraban en CTS, estas se incubaron durante 24 h a 35°C. Posteriormente, las laminillas se retiraron, se enjuagaron con agua destilada y fueron teñidas con cristal violeta al 1% por 10 min. A continuación, se enjuagaron las laminillas, se colocaron sobre un portaobjetos y se observaron al microscopio con objetivo de 40X.

Método en tubos de ensayo (O'Toole *et al.*, 1999).

La formación de biopelículas en tubos de ensayo se realizó de la siguiente manera: se tomaron 2 ml de la dilución 1:100 de los inóculos estandarizados, se incubaron en tubos de vidrio de borosilicato (BS) y plástico de polipropileno (PP) entre 24 a 35°C. Los tubos fueron lavados con agua destilada y teñidos con 2 ml de cristal violeta al 1% durante 30 min. Las biopelículas que se visualizaron se clasificaron como fuerte, moderada, débil o negativa, y pudieron ser cuantificadas mediante la adición de 2 ml de etanol al 95% y midiendo la DO del cristal violeta disuelto.

Método en microplacas de titulación (Passerini *et al.*, 2007).

Para este procedimiento se tomaron 200 µl de la dilución 1:100 de los inóculos estandarizados, se colocaron en los pocillos de una microplaca de titulación de poliestireno (PS) que se incubó durante 24 h a 35°C. Se estimó el total de biomasa celular, midiendo DO utilizando un lector de microplacas Elx 800. Posteriormente, las suspensiones bacterianas se decantaron y los pocillos se lavaron con agua destilada a fin de eliminar células no adherentes. Luego, se añadieron 200 µl del cristal violeta al 1% a los pocillos durante 30 min. La biopelícula teñida se aclaró con agua destilada y se extrajo con 200 µl de etanol al 95%. La cantidad de biopelículas se cuantificó midiendo la DO de la suspensión bacteriana coloreada con cristal violeta. Cada cepa fue analizada por triplicado. Se utilizaron controles de medios sin inocular a los cuales se les determinó la densidad óptica (DOc). El corte se definió

como tres desviaciones estándar por encima de la media DOc. Cada cepa se clasificó de la siguiente manera:

Productor débil de biopelícula	$DO \leq 2xDOc$
Productor de biopelícula moderado	$2xDOc < DO \leq 4xDOc$
Productor fuerte de biopelícula	$DO > 4xDOc$

Método en catéteres (Joyanes *et al.*, 2000).

Para este estudio se utilizaron catéteres de policloruro de vinilo (PCV) y silicona de las siguientes marcas: Feeding tube PCV (Viomed), Levin duodenal tube PCV (Knoxville Medical), Foley Silicona (Biometrix B.V.) y Sonda Foley Silicona (Sana-T). Dos catéteres de cada material se seccionaron en condiciones estériles en segmentos de 2 cm de longitud y se incubaron en 4 ml de la dilución 1:100 de cada inóculo estandarizado, durante 24 h a 35°C. Luego, los segmentos del catéter fueron removidos, lavados con solución salina fisiológica (SSF) y coloreados con cristal violeta al 1% por 3 minutos. Posteriormente se enjuagaron con SSF para eliminar el exceso de colorante. Las superficies colonizadas pudieron ser visualizadas mediante la coloración con cristal violeta y fueron clasificadas cualitativamente como productor de biopelículas fuerte, moderado o débil.

Determinación de la presencia de exopolisacáridos para la formación de biopelículas a través del método del rojo Congo (Bravo *et al.*, 2005).

Para ésta técnica, se sembraron 100 µl de la dilución 1:100 (10^6 células/ml) de cada inóculo estandarizado, por rastrilleo con una espátula de vidrio, en placas de AN con 0,025% del indicador rojo Congo, el cuál induce una morfología colonial característica de las cepas según produzcan o no exopolisacáridos, las placas fueron incubadas por 18 h a 35°C.

Determinación de la expresión del potencial de supervivencia

Método de sensibilidad al estrés oxidativo (Hassett *et al.*, 1999).

Se sembraron 100 µl de la dilución 1:100 de cada inóculo estandarizado en placas con ATS. Se impregnaron discos de papel de filtro Whatman (7 mm de diámetro) con 3 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 12% y se colocaron sobre la placa inoculada, incubándose por 24 h a 35°C. La sensibilidad al H₂O₂ al 12% se determinó como zonas de inhibición del crecimiento en torno a cada disco. La interpretación de los resultados se realizó con una zona de ensayo de inhibición, señalados por el autor del método con diámetros desde 14 a 21 mm, sobre la base de análisis estadístico, 3 grupos fueron significativamente definidos, clasificándose en resistentes (14-16 mm), resistencia intermedia (>16-18 mm) y sensibles (>18 mm).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo y los resultados obtenidos fueron expresados en tablas y/o gráficas de frecuencia, en la comparación de métodos cuantitativos se aplicó el análisis estadístico de Kruskal Wallis (Milton, 2007), para determinar si existen o no diferencias entre los métodos empleados para la evaluar la formación de biopelículas. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis microscópico de las biopelículas formadas por *S. maltophilia* sobre laminillas de vidrio de BS, mostró la presencia de una matriz de exopolisacáridos y microcolonias dispuestas en forma de malla, estructura típica de la arquitectura de las biopelículas. En este análisis se obtuvo que de 18 cepas de *S. maltophilia*, 14 (77,8%) formaron biopelículas fuertes y 4 (22,2%) biopelículas moderadas (Figura 1).

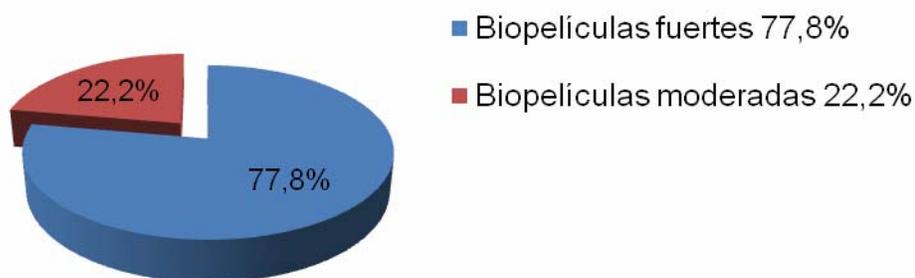


Figura 1. Formación de biopelículas por aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en laminillas de vidrio.

Los aislamientos con formación de biopelículas fuertes al BS mostraron al microscopio agregados de células bacterianas de gran tamaño formando microcolonias (Figura 2A), mientras que los aislamientos con formación de biopelículas moderadas mostraron agregados de menor tamaño (Figura 2B). *S. maltophilia* muestra la capacidad de vencer las fuerzas electrostáticas de la superficie pudiendo adherirse fácilmente a la superficie de vidrio. Estos resultados son comparables con un estudio realizado por Oliveira *et al.* (2002), en Sao Paulo, Brasil, en el que se demuestra la influencia de las propiedades fisicoquímicas en la adherencia de microorganismos a una superficie de vidrio, donde señalan que la

formación de la biopelícula es un proceso continuo que sigue varias fases de acondicionamiento, adhesión, síntesis del exopolisacárido, maduración y dispersión, mediante las cuales se estructuran acumulaciones celulares rodeadas de una matriz de polímeros.

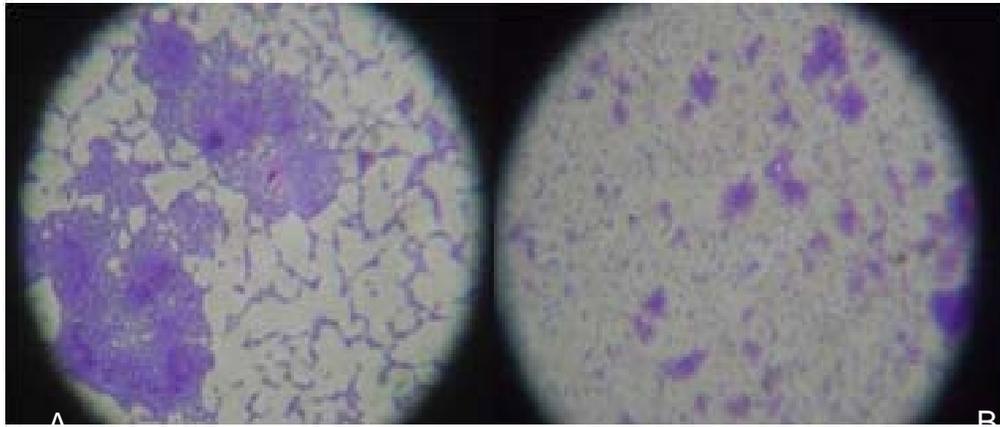


Figura 2. Biopelículas formadas por aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* sobre laminillas de vidrio. A) Agregación fuerte. B) Agregación moderada.

Al evaluar la formación de biopelículas por cepas de *S. maltophilia* en tubos de vidrio de BS y plástico de PP se obtuvo que 9 (50,0%) fueron productores fuertes de biopelículas, 7 (39,0%) productores moderados y 2 (11,0%) productores débiles en tubos de BS (Figura 3 y Apéndice 1A). En tubos de PP se observó que de las 18 cepas, 15 (83,0%) fueron productores fuertes de biopelículas y 3 (17,0%) fueron productores moderados (Figura 4 y Apéndice 1B).

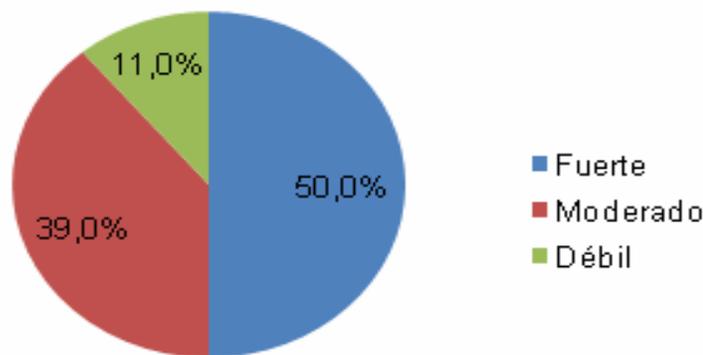


Figura 3. Formación de biopelículas por *Stenotrophomonas maltophilia* sobre tubos de borosilicato.

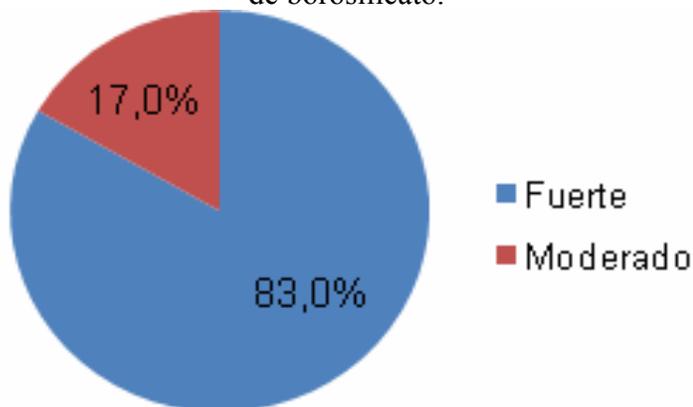


Figura 4. Formación de biopelículas por *Stenotrophomonas maltophilia* sobre tubos de polipropileno.

La formación de biopelículas fue evaluada en microplacas de PS, todas las cepas de *S. maltophilia* fueron productores fuertes de biopelículas (Apéndice 2). Se determinó la biomasa celular para evaluar si existe relación de ésta con la formación de biopelículas en microplacas de PS, por lo que se determinó previo al tratamiento con cristal violeta las densidades ópticas de los cultivos puros. Cabe destacar que 5 cepas (Sm 3, Sm5, Sm10, Sm11, Sm12), presentaron los índices más altos de biomasa o DO en sus lecturas iniciales, al realizar la medición de sus densidades ópticas de las biopelículas formadas y coloreadas con cristal violeta, se encontró que sus niveles de DO eran menores que las lecturas iniciales, sin embargo cepas que mostraron niveles más bajos de DO inicialmente (Sm8, Sm14, Sm15, Sm16, Sm18) presentaron valores más altos después de la tinción con cristal violeta (Figura 5).

Los resultados obtenidos en esta etapa del estudio podrían sugerir que la capacidad de formar biopelículas no fue directamente proporcional a la biomasa celular. Las elevadas lecturas pudieron deberse a que estas cepas presentaron mayor

turbidez y mucosidad, asociado a la presencia de gran cantidad de exopolisacáridos, lo cual probablemente pudo influir y elevar el valor en sus biomazas.

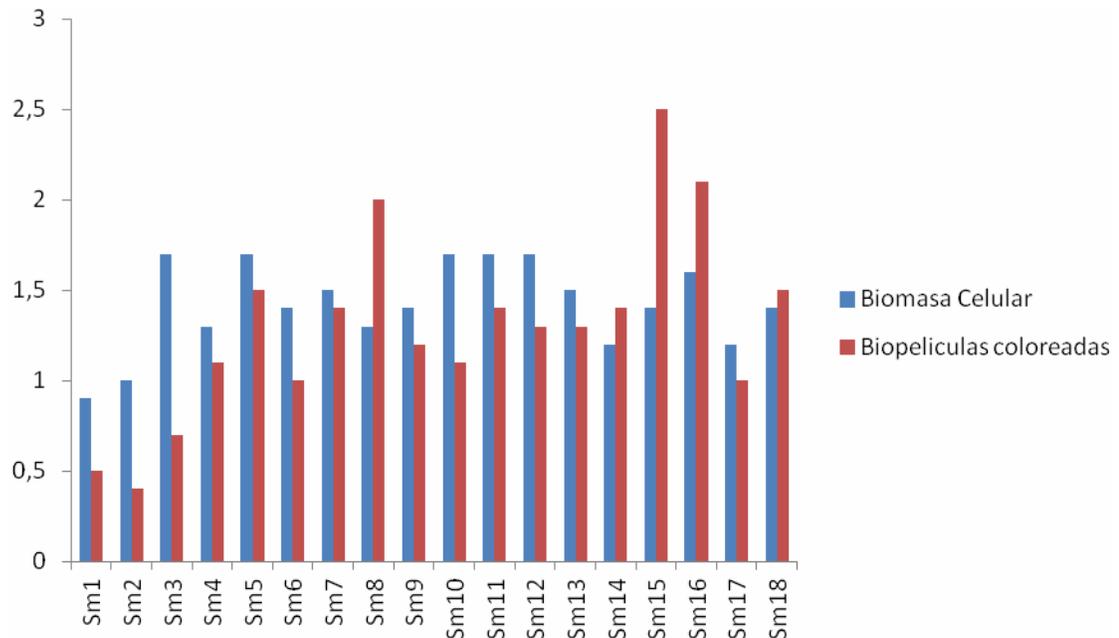


Figura 5. Relación entre la biomasa celular y la formación de biopelículas en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*.

El análisis de los resultados en las pruebas de determinación de biopelículas en superficies de plástico permite sugerir, que *S. maltophilia* tiene mayor habilidad de adherirse sobre superficies como el PS, PP. Esto es debido a que posee fimbrias que le permiten aferrarse a múltiples superficies como plástico y vidrio.

Oliveira *et al.* (2003) han realizado estudios donde se ha caracterizado flagelos y fimbrias tipo 1 producidas por *S. maltophilia*, donde señalan que estos factores determinantes de la superficie pueden participar en la formación de biopelículas debido a que favorecen la adherencia de este microorganismo a múltiples superficies. Este microorganismo en condiciones fisiológicas posee carga superficial positiva que

es producida por las proteínas situadas en la membrana externa y que son fuertemente atraídas por las cargas superficiales negativas del vidrio y plástico.

La formación de biopelículas fue demostrada por O'Toole y Kolter (1998) en *P. aeruginosa*, quienes reportaron que las estructuras como fimbrias y flagelos eran importantes para los primeros estadios de formación de biopelículas, ya que la motilidad, otorgada por los flagelos, ayudaría a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de adhesión (Nazar, 2007).

Passerini *et al.* (2007), en un estudio realizado en 13 cepas de *S. maltophilia* provenientes de pacientes hospitalizados en la clínica José de San Martín, en la ciudad de Buenos Aires, Argentina, observaron que todas las cepas de *S. maltophilia* fueron productores fuertes de biopelículas en microplacas de PS, mientras que las diferencias en la capacidad de formación de biopelículas se observaron en BS y PP, señalando que *S. maltophilia* tiene la habilidad de adherirse al vidrio y a varios tipos de plásticos, los cuales se utilizan en la fabricación de dispositivos médicos.

La formación de biopelículas también fue evaluada mediante la técnica en catéteres, para ésta se utilizaron catéteres de silicona y policloruro de vinilo (PCV), comúnmente empleados en los centros asistenciales de salud y en especial en el HUAPA, lugar de donde fueron aisladas las cepas en estudio. Se observó la adhesión de biopelículas sobre la superficie de los catéteres mediante la coloración con cristal violeta. En los catéteres de PCV, todas las cepas de *S. maltophilia* formaron biopelículas fuerte (100%), mientras que en los catéteres de silicona se obtuvo que de las 18 cepas, 4 (22,2%) formaron biopelículas fuertes, 7 (38,9%) formaron biopelículas moderadas y 7 (38,9%) formaron biopelículas débiles, observándose diferencias entre los dos materiales (Figura 6).

Estos resultados difieren de los reportados por Joyanes *et al.* (2000), en un estudio sobre la formación de biopelículas en cepas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* sobre catéteres de silicona y PCV, donde señalan que no existen diferencias significativas entre los dos materiales.

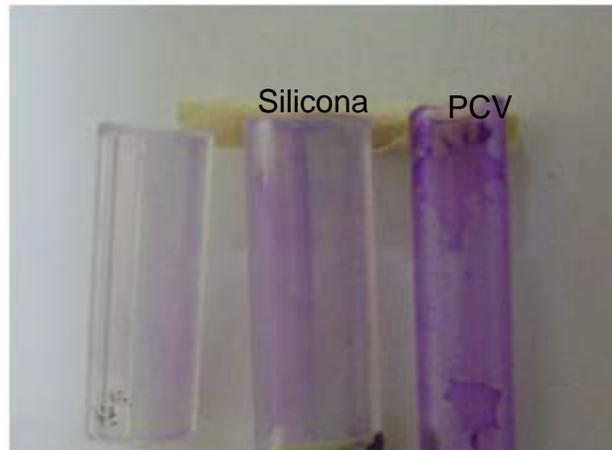


Figura 6. Biopelículas formadas por *Stenotrophomonas maltophilia* en catéteres de silicona y policloruro de vinilo.

Los resultados cuantitativos de las técnicas empleadas para la formación de biopelículas fueron comparados a través de el análisis estadístico de Kruskal Wallis para la comparación de métodos (Milton, 2007), encontrándose diferencias altamente significativas entre las lecturas ($P < 0,05$) utilizando como prueba de referencia la técnica de microplaca comparada con las técnicas de tubos de vidrio y plástico (Tabla 1; Figura 7). Estos resultados mostraron que la técnica de microplaca resultó ser superior a la técnica de tubos en términos de sensibilidad ya que mediante ésta se obtuvieron promedios de DO mayores indicando ser más efectiva.

Tabla 1. Análisis de Kruskal Wallis para las lecturas cuantitativas de las diferentes técnicas aplicadas para la formación de biopelículas en *Stenotrophomonas maltophilia*.

Técnica	Tamaño muestral	Rango promedio DO
Tubos de vidrio	18	15,2778

Tubos de plástico	18	28,1389
Microplaca	18	39,9211

KW= 21,8761 Valor P obtenido= 0,000017769, $P < 0,05$
KW: estadístico de Kruskal Wallis; P: Probabilidad; DO: Densidad óptica.

La técnica de microplacas resultó ser altamente sensible, la cual puede ser aplicada como una herramienta cuantitativa confiable para determinar la formación de biopelículas.

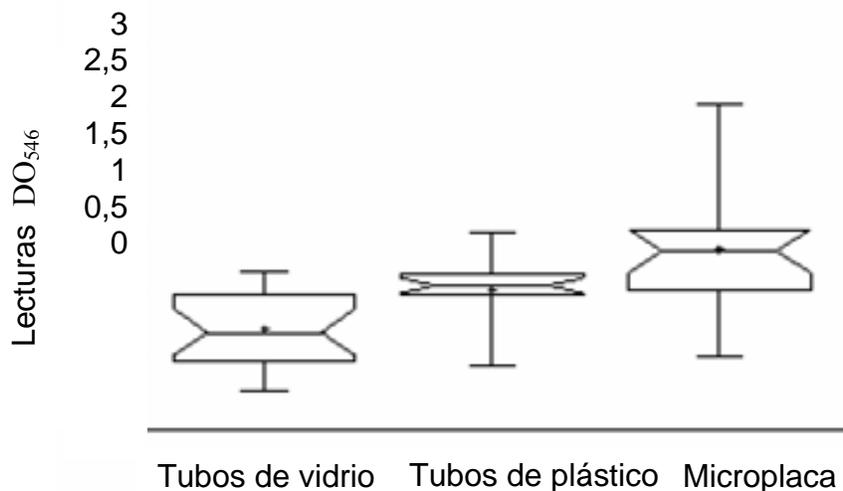


Figura 7. Variación de los métodos utilizados para la lectura de biopelículas en *Stenotrophomonas maltophilia*.

Aun cuando la técnica de microplacas es considerada de elección en este tipo de estudios, mediante la técnica en tubos de ensayo las cepas formaron biopelículas sobre superficies hidrófilas (BS) e hidrófobas (PP). Esto es debido a que la unión de las bacterias a una superficie ocurre más fácilmente en aquellas que son hidrofóbicas como plásticos y teflón, que en superficies hidrofílicas como vidrios y metales, sin embargo *S. maltophilia* presentó gran habilidad para formar biopelículas en distintas superficies.

En un estudio realizado por Mathur *et al.* (2006), sobre la formación de biopelículas a través de las técnica de tubos y microplaca en 152 cepas de

Staphylococcus sp., señalaron que mediante esta técnica, pudieron detectar la formación de biopelículas en 82 cepas (53,9%) mientras que con la técnica de tubo resultó escasa la detección de las cepas formadoras de biopelículas.

Al determinar la presencia de exopolisacáridos a través del método del rojo Congo, se observó que de las 18 cepas en estudio, 14 cepas (77,8%) resultaron ser productoras de exopolisacáridos, mostrando colonias de color blanco (Figura 8A) y las 4 cepas restantes (22,2%) fueron no productoras de exopolisacáridos, presentando colonias de color rojo (Figura 8B). Estos resultados demostraron que aunque no todas las cepas fueron productoras de exopolisacáridos si formaron biopelículas, esto puede ser debido a que independientemente de la expresión del exopolisacárido, otros componentes en la matriz como polisacáridos ricos en glucosa, mannososa, galactosa y trazas de xilosa podrían ser necesarios para la formación de biopelículas (Friedman y Kolter, 2004).

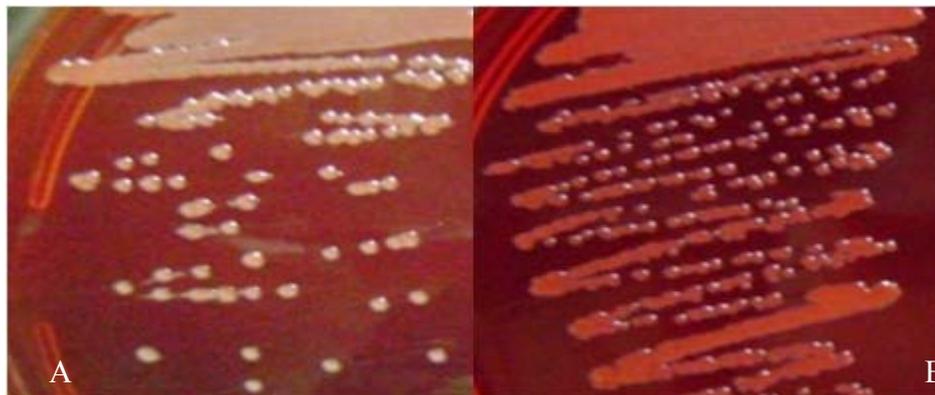


Figura 8. Producción de exopolisacáridos por el método de rojo Congo en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*. A) Colonias blancas productoras de exopolisacáridos cepa Sm18, B) Colonias rojas no productoras de exopolisacáridos cepa Sm13.

En un estudio realizado por Passerini *et al.* (2007), en Argentina, sobre la formación de biopelículas en cepas de *S. maltophilia* asociadas a dispositivos médicos en infecciones intrahospitalarias, se detectó la producción de

exopolisacáridos en 13 cepas de *S. maltophilia*. Encontrándose que de éstas, sólo 8 (62,0%) fueron productoras de exopolisacáridos, mientras que 5 (38,0%) fueron no productoras de exopolisacáridos.

Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron reportados por Bravo *et al.* (2005), en un estudio realizado en Cuba donde se evaluó la producción de exopolisacáridos en 40 cepas de *Plesiomonas shigelloides*, donde señalan que 30 cepas (75,0%) fueron productoras de exopolisacáridos y 10 (25,0%) fueron no productoras de exopolisacáridos. Así mismo Callicó *et al.* (2004), en un estudio sobre la caracterización fenotípica y factores de virulencia en la ciudad de la Habana Cuba, en 18 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, reportaron que 72,0% de las cepas produjeron colonias de color blanco por lo que se puede considerar que estas cepas fueron productoras de exopolisacárido. Estos dos estudios señalan que la poca absorción del colorante rojo Congo puede deberse a la pérdida o modificación de un ligando o a la secreción de un factor que impide la unión del rojo Congo.

El crecimiento de las colonias blancas en agar rojo Congo sugiere un incremento en la producción de exopolisacáridos debido a que las cepas no son capaces de absorber el colorante rojo Congo, debido a que este es de naturaleza aniónica y el exopolisacárido está cargado negativamente, generando una repulsión de las cargas e impidiendo que ocurra la absorción del colorante en las colonias productoras de exopolisacáridos (Harrison *et al.*, 2003 y Callicó *et al.*, 2004). La producción de ésta matriz se considera un importante factor de virulencia en *S. maltophilia* debido a que proporciona una barrera física y química dado que neutraliza los radicales libres liberados por los macrófagos y también proporciona protección contra la fagocitosis, además interactúa con el medio externo y a diferencia de las proteínas, los exopolisacáridos son moléculas muy sencillas, que no tienen capacidad de inducir respuesta de anticuerpos ya que las células de los

mamíferos están recubiertas de polisacáridos antigénicamente similares (Chung *et al.*, 2003).

A todas las cepas de *S. maltophilia* productoras de biopelículas se le evaluó su capacidad de sobrevivir al estrés oxidativo del H₂O₂ al 12% (Apéndice 3). Donde se observó que 16 cepas fueron sensibles y no sobrevivieron a la acción del H₂O₂ sin embargo la cepa 18 presentó un diámetro de 16 mm (Figura 9A), resultando ser resistente y capaz de sobrevivir al estrés oxidativo mientras que la cepa 11 mostró resistencia intermedia con un diámetro de 18 mm (Figura 9B). Estos resultados son comparables con los reportados por Passerini *et al.* (2007), quienes obtuvieron resultados similares en un estudio realizado en 13 cepas de *S. maltophilia* provenientes del Hospital José de San Martín en la ciudad de Buenos Aires, Argentina, donde sólo 1 cepa, fue resistente al H₂O₂, mientras que las 12 cepas restantes fueron sensibles al estrés oxidativo causado por el H₂O₂.



Figura 9. Capacidad de supervivencia de *Stenotrophomonas maltophilia* ante la exposición con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). A) cepa 18 resistente. B) cepa 11 resistencia intermedia.

Las bacterias del género *Stenotrophomonas* presentan la enzima catalasa que degrada el H₂O₂ en agua y oxígeno. Los resultados de este estudio demuestran la

acción bactericida de este compuesto químico sobre la bacteria, ya que el oxígeno liberado del catabolismo es tóxico para las mismas y tiene una acción oxidante a nivel de membrana a través de la formación de radicales libres.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar y erradicar a los patógenos. El estrés oxidativo ocurre como consecuencia de un aumento en la síntesis o una disminución en la degradación de ERO, produciéndose un incremento en la concentración intracelular de estos oxidantes. Durante el metabolismo aerobio se generan pequeñas cantidades de ERO, incluyendo radicales hidroxilo (OH^\cdot), aniones superóxido (O_2^\cdot), y H_2O_2 , como respuesta a estímulos externos e internos.

En una infección aguda, el sistema inmunitario utiliza los efectos de las ERO como mecanismo para erradicar a los agentes patógenos; con la producción de los fagocitos activados de ERO, pero en infecciones prolongadas, los fagocitos tienden a morir liberando radicales oxigenados tóxicos que afectan a las células vecinas (Peretó, 2007). Estas mínimas concentraciones de ERO pueden ser indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares, que está relacionado con otros procesos como la proliferación celular y la apoptosis, la inmunidad, y la defensa contra microorganismos. Sin embargo, altas dosis o una eliminación inadecuada de ERO dan lugar al estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daños a macromoléculas biológicas. Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica, cuya prevención es esencial en todos los organismos aerobios, ya que los productos derivados de este proceso pueden interactuar con el ADN y son potencialmente mutágenos, afectando los diferentes procesos esenciales del microorganismo (Cárdenas y Davies, 2000).

CONCLUSIONES

Stenotrophomonas maltophilia demostró ser un microorganismo que tiene la capacidad de formar biopelículas sobre diferentes superficies hidrófilas e hidrófobas.

La técnica de microplaca presentó alta sensibilidad para detectar las biopelículas, en comparación con la técnica de tubo, aunque ésta permitió ver de igual forma la formación de biopelículas.

La técnica en catéteres de distintos materiales permitió observar que *S. maltophilia* tuvo mayor adherencia sobre catéteres de PCV que en los catéteres de silicona.

La producción de exopolisacáridos no está directamente relacionada con la formación de biopelículas. Ya que no todas las cepas en estudio fueron productoras de exopolisacáridos, sin embargo todas formaron biopelículas.

S. maltophilia fue sensible al estrés oxidativo con H₂O₂ al 12%, no sobreviviendo en su mayoría al efecto biocida del peróxido de hidrógeno.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de investigación sobre los mecanismos que influye en la formación de biopelículas a fin de emplear estrategias que permitan la disminución y posible erradicación de las mismas, sin que resulten perjudiciales para la salud.

Desarrollar conferencias y charlas acerca de este tema para todo el personal de salud y público en general, sobre los problemas que pueden generar estas biopelículas.

Invertir en proyectos de investigación que permitan ampliar este tipo de estudios para que puedan ser implementados como métodos de referencia por el personal de laboratorio para la identificación de este microorganismo.

Emplear el uso de materiales que disminuyan la adherencia de las bacterias formadoras de biopelículas sobre su superficie, aunque se requiera de un estudio más extenso sobre el tema.

BIBLIOGRAFÍA

Antón, D.; Araque, Y. y De Donato, M. 2005. Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de cepas clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia*. *Kasmera*, 33: 109-118.

Berg, G.; Roskot, N. y Smalla, K. 1999. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal Clinical of Microbiology*, 37: 3594-3600.

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

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

Cabrera, E., Gómez, F. y Zuniaga, A. 2007. La Resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación, *Colombia Médica*, 39(2):149-158.

Callicó, A.; Cedre, B.; Sifontes, S.; Torres, V.; Pino, Y.; Callis, A. y Esnard, S. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccimonitor*, 3: 13-22.

Cárdenas, E. y Davies, K. 2000. Mitochondrial free radical generation oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 220-230.

Cercenado, E. 2006. “*Stenotrophomonas maltophilia*: un patógeno nosocomial emergente”. “Monografía en Internet”. <http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/Smalto.htm> (26/01/09).

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

Corzo, J. y Gómez, J. 2006. *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno nosocomial de importancia creciente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 4: 1-3.

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

Costerton, J.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D.; Korber, D. y Lappin, H. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49: 711-745.

Costerton, J.; Philip, S. y Greenberg, E. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322.

Crispino, M.; Boccia, M.; Bagattini, M.; Villari, P.; Triassi, M. y Zarrilli, R. 2002. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* in a university hospital. *Journal Hospital Infection*, 52: 88-92.

Davey, M. y O'Toole, G. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64: 847-867.

Del Toro, M.; Rodríguez, J.; Martínez, L.; Pascual, A.; Pérez, R.; Perea, E.; y Muniain, M. 2006. Epidemiology, clinical features and prognosis of infections due to *Stenotrophomonas maltophilia*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24: 4-9.

Denton, M. y Kerr, K. 1998. Microbiology and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 57-80.

Denton, M.; Todd, N.; Kerr, K.; Hawkey, P. y Littlewood, J. 1998. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *Journal Clinical Microbiology*, 36: 1953-1958.

Donlan, R. 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 277-281.

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

Harrison, C.; Cazzaniga, A.; Stephen, B. y Mertz, P. 2003. A wound isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows formed biofilms in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatologic Surgery*, 29(69): 631-639.

Hassett, D.; Ma, J.; Elkins, J.; McDermott, T.; Ochsner, U. y West, S. 1999. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilms susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology*, 34: 1082-1093.

Hugh, R. y Ryschenkow, E. 1961. *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. *Journal Genetic of Microbiology*, 26: 123-132.

Hugh, R. y Gilardi, G. 1980. *Pseudomonas*. In: *Manual of clinical microbiology*

Lenette, E.; Balows, A.; Hausler, W. Jr.; Truant, J.P. (eds). *American Society for Microbiology*, Tercera edición. Washington, D.C.

Jennie, L.; Garison, T. y McLendon, P. 2003. Risk factors for *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in oncology patients: a case-control study. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24: 269-274.

Joyanes, P.; Pascual, A.; Martínez, L.; Hevia, A. y Perea, J. 2000. In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to urinary catheters. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19: 124-127.

Jucker, B.; Harms, H. y Zehnder, A. 1996. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Bacteriology*, 178: 5472-5479.

Juliet, L.; Chrystal, E. y Fernández, V. 2006. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Revista Chilena de Infectología*, 23(3): 247-248.

Julve, R.; Rovira, E.; Belda, A.; Prat, J.; Escoms, R.; Albert, A. y Gonzalvo, F. 1998. Espectro clínico de la infección por *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *Annual Medicine Internal*, 15: 476-480.

Kim, L. 2001. Riddle of Biofilms Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 999-1007.

Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D.; Fatma, T.; y Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical insulates of *Staphylococcus*: an

evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24(1): 25-29.

Milton, S. 2007. Estadística para Biología y Ciencias de la Salud. Tercera edición. McGraw-Hill. España.

McGowan, J. 2006. Resistance in non fermenting gram negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Annual Journal of Infectology Control*, 34: 29-37.

Mooney, L.; Kerr, K. y Denton, M. 2001. Survival of *Stenotrophomonas maltophilia* following exposure to concentrations of tobramycin used in aerosolized therapy for cystic fibrosis patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17: 63-66.

Muñoz, E., Gómez, M. y Moreno, G. 2010. Efecto antibacteriano de 5 antisépticos de uso en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana*.

Nazar, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 67: 61-72.

Nesme, X.; M, Vaneechoutte.; S, Orso.; B, Hoste. y J, Swinngs.1995. Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S ARNr gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 18: 127 -135.

Nicodemo, A. y Páez, J. 2007. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26: 229-237.

Oliveira, D.; Timenetsky J.; Baquerizo, M.; Waldemar, F.; Sumiko I.; y Mitio, R. 2002. Proteases (caseine and elastase), hemolysins, adhesion and susceptibility to antimicrobials of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates obtained from clinical specimens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(2): 1517 -1590.

Oliveira, D.; Dall'Agnol, M.; Rosales, M.; Azzuz, A.; Alcantara, N.; Martinez, M. y Giron, J. 2003. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiology*, 5: 625-636.

O'Toole, G. y Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2): 295-304.

O'Toole, G.; Pratt, L.; Watnick, P.; Newman, D.; Weaver, V. y Kolter, R. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymology*, 310: 91-109.

Palleroni, N. y Bradbury, J. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh, 1980) Swings *et al.* 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43: 606-609.

Papapetropoulou, M.; Iliopolou, J.; Rodopolou, G.; Detorakis, J. y Paniara, O. 1994. Occurrence and antibiotic resistance of *Pseudomonas* species isolated from drinking water in southern Greece. *Journal of Chemotherapy*, 6: 111-116.

Passerini, B.; Calenda, M.; Vay, C. y Franco, M. 2007. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from decive-associated nosocomial infections. *Revista Argentina de Microbiología*, 39: 204-212.

Peretó, J. 2007. Fundamentos de Bioquímica. Quinta edición Editorial Reverte. España.

Prescott, L.; Harley, J. y Klein, D. 2004. *Microbiología*. Quinta edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid.

Rice, C. y Gopinathan, V. 1995. Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. *Essays Biochemical*, 29: 39-63.

Sevillano, D.; Valdezate, S. y Gómez, M. 2001. An update of the susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Revista Española de Quimioterapia*, 14: 138-154.

Senol, E. 2004. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *Journal Hospital Infection*, 57: 1-7.

Stewart, P. y Costerton, J. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358: 135-138.

Socransky, S. y Haffajee, A. 2003. Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontol 2000*, 3: 12-55.

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

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

Swings, J.; De Vos, P.; Van, M. y De Ley, J. 1983. Transfer of *Pseudomonas*

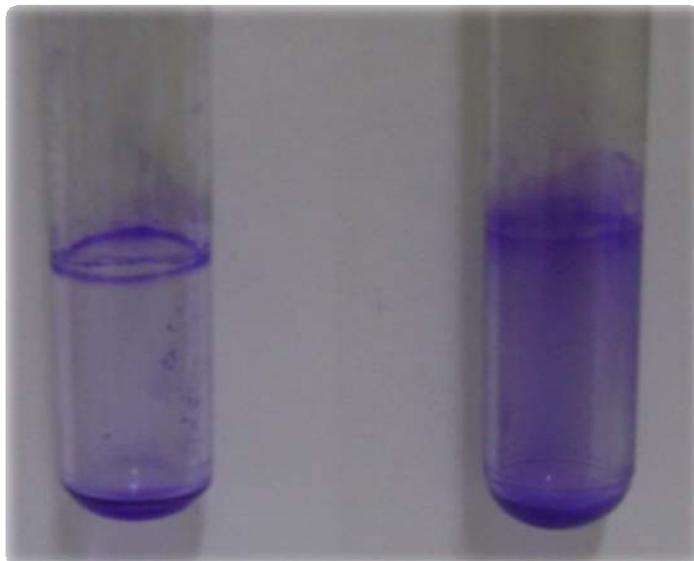
maltophilia to the genus *Xanthomonas maltophilia* comb. nov. *Internal Journal of Systematic Bacteriology*, 33: 409-413.

Valdezate, S.; Vindel, A.; Martin, P.; Del Saz, B.; Baquero, F. y Cantón, R. 2004. High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. *Journal Clinical of Microbiology*, 42: 693-699.

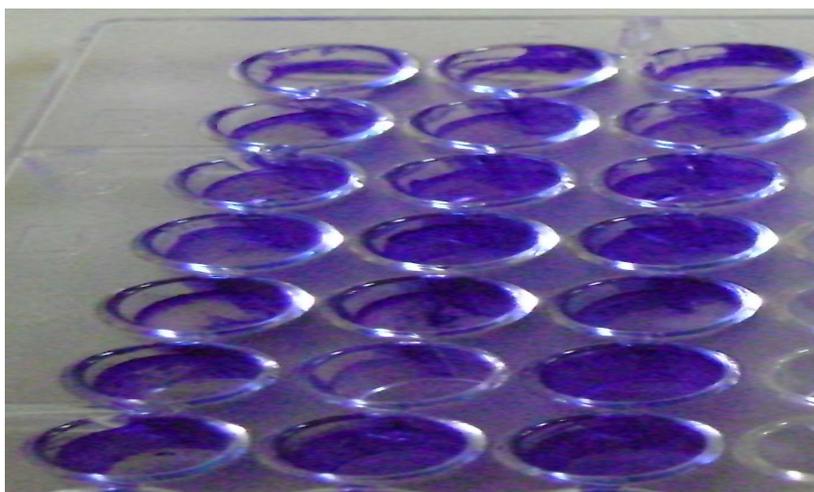
Villarino, M.; Stevens, L.; Schable, B.; Mayers, G.; Miller, J.; Burke, J. y Jarvis, W. 1992. Risk factors for epidemic *Xanthomonas maltophilia* infection-colonization in intensive care unit patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 13: 201-206.

Watnik, P. y Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182: 2675-2676.

APÉNDICES



Apéndice 1. Biopelículas formadas por *Stenotrophomonas maltophilia* en tubos A) Borosilicato. B).Polipropileno.



Apéndice 2. Biopelículas formadas por *Stenotrophomonas maltophilia* visualizadas en microplacas de poliestireno.

Sm	Método de laminillas de vidrio	Método de tubos de borosilicato	Método de tubos de polipropileno	Microplaca de poliestireno	Método en catéter de PVC	Método en catéter de silicona	Método del rojo congo	Método de sensibilidad al estrés oxidativo
1	Moderado	Moderado	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Moderado	+	Sensible
2	Fuerte	Débil	Moderado	Fuerte	Fuerte	Moderado	+	Sensible
3	Fuerte	Débil	Moderado	Fuerte	Fuerte	Débil	+	Sensible
4	Fuerte	Moderado	Moderado	Fuerte	Fuerte	Débil	+	Sensible
5	Fuerte	Moderado	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	+	Sensible
6	Fuerte	Moderado	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Débil	-	Sensible
7	Moderado	Moderado	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Débil	+	Sensible
8	Fuerte	Moderado	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Débil	+	Sensible
9	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Débil	+	Sensible
10	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Débil	-	Sensible
11	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Moderado	-	Intermedio
12	Moderado	Moderado	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Moderado	+	Sensible
13	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	-	Sensible
14	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Moderado	+	Sensible
15	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	+	Sensible

16	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Moderado	+	Sensible
17	Moderado	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Moderado	+	Sensible
18	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	+	Resistente

Apéndice 3. Cuadro comparativo de todos los métodos empleados

OBJETIVOS

General

Evaluar la capacidad de formar biopelículas en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, aisladas de pacientes hospitalizados en unidades de cuidados críticos del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA) y asociadas a infecciones intrahospitalarias, sobre diferentes superficies de vidrio y plástico, y la expresión del potencial de supervivencia.

Específicos

Demostrar la formación de biopelículas en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* sobre superficies de vidrio (laminillas y tubos de borosilicato) y plásticos (tubos de polipropileno, microplacas de poliestireno y catéteres de silicona y policloruro de vinilo).

Comparar los métodos cuantitativos empleados para la formación de biopelículas en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*

Detectar la presencia de exopolisacáridos en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Evidenciar la expresión del potencial de supervivencia en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* al estrés oxidativo.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	FORMACIÓN DE BIOPÉLICULAS POR AISLADOS DE Stenotrophomonas maltophilia PROVENIENTES DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EN UNIDADES DE CUIDADO CRÍTICO.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Small Bermudez, Samia Sapphiro	CVLAC	18174954
	e-mail	Samiasmallb15@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Biopelículas
Stenotrophomonas maltophilia
Exopolisacáridos
Estrés oxidativo

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se evaluó la formación de biopelículas en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* asociadas a infecciones intrahospitalarias, sobre diferentes superficies y su capacidad de supervivencia al estrés oxidativo. 18 cepas de *S. maltophilia* fueron ensayadas, se les determinó la capacidad de formar biopelículas sobre laminillas de vidrio de borosilicato, tubos de borosilicato (BS) y polipropileno (PP), microplacas de poliestireno (PS), catéteres de policloruro de vinilo (PCV) y silicona, y se evidenció la producción de exopolisacáridos a través del método de rojo Congo, el potencial de supervivencia se determinó mediante el método de sensibilidad al estrés oxidativo con peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 12%. Todas las cepas fueron formadoras de biopelículas sobre los materiales empleados. En laminillas de vidrio se observó que 14 (77,8%) formaron biopelículas fuertes y 4 (22,2%) biopelículas moderadas. En tubos de BS 9 (50,0%) fueron productores fuertes, 7 (38,9%) productores moderados y 2 (11,1%) productores débiles de biopelículas. Mientras que en tubos de PP se observó que 15 (83,3%) producían biopelículas fuertes y 3 (16,7%) biopelículas moderadas. En microplacas de PS y catéteres de PCV, todas las cepas (100,0%) formaron biopelículas fuertes mientras que en catéteres de silicona, 4(22,2%) fueron productores fuertes, 7(38,9%) productores moderados y 7 (38,9%) fueron productores débiles de biopelículas. Al comparar los métodos cuantitativos, se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) entre las técnicas de microplaca de PS, tubos de BS y tubos de PP, donde la técnica de microplaca de PS resulto ser más efectiva y recomendable para ser aplicada como una herramienta cuantitativa confiable para la formación de biopelículas. De las 18 cepas en estudio, 14 cepas (77,8%) resultaron ser productoras de exopolisacáridos, mostrando colonias de color blanco y 4(22,2%) fueron no productoras presentando colonias de color rojo. En cuanto a la capacidad de la bacteria de sobrevivir al H₂O₂ al 12%, 16 cepas (84,6%) resultaron sensibles, 1 (7,7%) intermedia y 1 (7,7%) resistente a la acción del peróxido. La técnica de microplaca de PS demostró ser de gran precisión evidenciando la formación de biopelículas por *S. maltophilia*. Debido a que este microorganismo posee carga superficial positiva a pH fisiológico, favorece su adherencia a materiales con carga negativa como PCV y silicona, comúnmente utilizados en la fabricación de implementos médicos, facilitando procesos de infección/colonización asociados al uso de técnicas invasivas, como cateterismo, intubación y traqueotomía. *S. maltophilia* fue sensible al estrés oxidativo con H₂O₂

al 12%, no sobreviviendo en su mayoría al efecto biocida del peróxido de hidrógeno.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Antón, Dina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8647499
	e-mail	dinacar@hotmail.com
	e-mail	
Araque, Yasmina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8000717
	e-mail	yamasi40@hotmail.com
	e-mail	
Ponce, Yusulbeth	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11829822
	e-mail	yusulbeth@yahoo.es
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	04	10

Lenguaje: Spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-Small.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial: Nacional

Temporal: Temporal

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Bioanálisis

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

Universidad de Oriente

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

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

Estimado Profesor Martínez:

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

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *[Firma]*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

[Firma]
JUAN A. BOLANOS CUNEL
Secretario

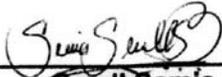


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación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

JABC/YGC/maruja

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

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


Small Samia
Autor


Antón Dina
Asesor


POR LA COMISIÓN DE TRABAJO DE GRADO