



AVENTURAS DEL PENSAMIENTO

Efecto de la formación de BIOPELÍCULAS EN LA RESISTENCIA DE BACTERIAS AISLADAS de especímenes clínicos

JORGE LUIS MARQUEZ LÓPEZ, GUADALUPE VIRGINIA NEVÁREZ MOORILLÓN,
ARACELY DÁVILA SÁNCHEZ, BLANCA ESTELA RIVERA CHAVIRA y OLGA GONZÁLEZ RANGEL
Facultad de Ciencias Químicas/Universidad Autónoma de Chihuahua

En la naturaleza, las bacterias han formado agrupaciones con cualidades que les permiten adaptarse y sobrevivir a agentes como desinfectantes y depredadores, que de forma individual no lograrían resistir. Una de esas agrupaciones son las biopelículas,^{1,3} que fueron descritas por primera vez en 1978.⁴ Es tan diverso el lugar donde se pueden formar las biopelículas, que se han encontrado en hojas de perejil, rocas, dientes e incluso en recipientes

de aluminio para el almacenamiento de combustible nuclear.⁹

La formación de biopelículas consta de tres etapas: adsorción reversible, adsorción irreversible y crecimiento. Pueden llegar a ser tan grandes que se vuelven visibles, principalmente en rocas sumergidas en ambientes marinos, lagos, ríos, etcétera.⁶ En el ambiente intrahospitalario se han convertido en un fuerte problema, pues se han encontrado formaciones de biopelículas en dispositivos médicos: catéteres, válvulas mecánicas del corazón, aparatos intrauterinos y hasta lentes de contacto.⁴



Neophasia Menapia.

Además de poder crecer en superficies inanimadas, pueden formarse en tejido vivo y provocar infecciones similares a las desarrolladas por bacterias en estado libre (plantónicas), pero presentan una mayor resistencia tanto a los antibióticos como al sistema inmunológico.⁸

Algunas de las enfermedades descritas y relacionadas a la formación de biopelículas son: la otitis media, la fibrosis quística, la amigdalitis e infecciones de vías urinarias asociadas a pacientes con uso de catéteres, entre otras. En algunas infecciones oculares, se describe a *Staphylococcus epidermidis* como una de las bacterias frecuentemente aisladas, y por lo común considerada como un saprófito humano y presenta perfiles de resistencia a los antibióticos (oxacilina, vancomicina) y con gran capacidad de formación de biopelículas.^{3,4,10,11}

La multiresistencia de bacterias aisladas de especímenes clínicos es de importancia en las infecciones nosocomiales. Dichas bacterias, además de la resistencia antimicrobiana, se caracterizan por una mayor virulencia; situación que afecta a los pacientes hospitalizados relacionados con múltiples factores de riesgo. Las infecciones nosocomiales se asocian a morbimortalidad elevada; aumentan los costos de operación de los hospitales por empleo de antibióticos y procedimientos más costosos y prolongan la estancia hospitalaria de los enfermos infectados.

Son tres los posibles mecanismos por los que la biopelícula brinda resistencia a las bacterias. El primero es la penetración lenta o incompleta del antibiótico a través de la matriz extracelular. El antibiótico es degradado antes de llegar a la pared celular impidiendo su acción. El segundo es la alteración química del antibiótico dentro de la biopelícula. En el interior de la matriz se consume el oxígeno, dejando un ambiente anaerobio en el que las bacterias producen desechos ácidos, que pueden cambiar el pH del microambiente; situación que no favorece a la acción de algunos antibióticos o hace más lento el crecimiento bacteriano. El tercero consiste en que una pequeña población de la biopelícula está altamente protegida, semejante a la esporulación y permanecen las bacterias intactas, a pesar de la continua exposición al antibiótico.⁸

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de formación de biopelícula de bacterias multiresistentes, comparando el comportamiento de cultivos puros y en biopelícula frente a antibióticos, utilizando métodos que incluyen la tinción y cuantificación de



Parnassius.

biopelícula con cristal violeta. Se comprobó que en la mayoría de las cepas analizadas, la biopelícula fue el principal mecanismo de defensa ante la exposición a los antibióticos. Los resultados obtenidos demuestran que las biopelículas son difíciles de erradicar, sobre todo cuando ya están formadas.

Metodología

Cepas y antibióticos. Se analizaron 8 cepas bacterianas proporcionadas e identificadas como multiresistentes por el laboratorio de microbiología del Hospital Clínica del Parque, Chihuahua. Las cepas utilizadas fueron: 1 cepa de *Klebsiella pneumoniae*, 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 3 cepas de *Acinetobacter baumannii* y 1 cepa de *Staphylococcus haemolyticus*. Las cepas se conservaron en medio de soya tripticaseína. Se seleccionaron dos antibióticos para cada una de las cepas a partir de la siguiente lista: amikacina, cefotaxima, cefuroxima, ampicilina, imipenem, y vancomicina. Las pruebas se realizaron siguiendo el esquema general mostrado en la figura 1.

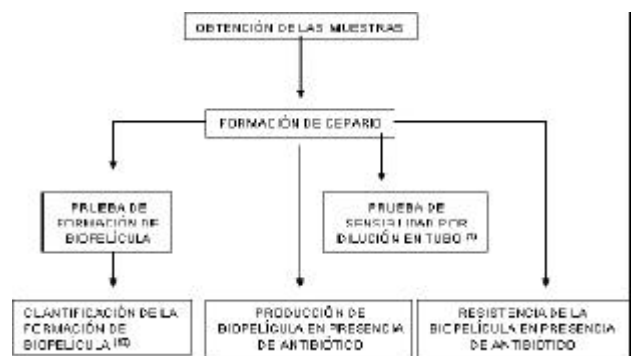


Figura 1. Diagrama de flujo de las pruebas de formación de biopelícula y su resistencia en presencia de antibióticos.

Formación de biopelícula en tubo (prueba cualitativa). Se inoculó el microorganismo en tubo de vidrio o en una microplaca, en caldo de soya tripticaseína (CST) y se incubó por 24 horas a 37°C en condiciones

aerobias. Después se removió el contenido con una pipeta y se agregó una solución de safranina, dejando reposar por un minuto. Se vació la safranina y los tubos permanecieron en reposo por 24 horas. La prueba se consideró positiva cuando se encontró alguna capa teñida en la superficie cercana al tubo.

Formación de biopelícula en placa (prueba cuantitativa). Se colocó el inóculo en 200µl de CST en pocitos de una microplaca de ELISA y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se removió el contenido y cada pozo se lavó tres veces con 250µl de solución salina. Luego se llenaron con 200µl de metanol al 99% y se dejaron reposar por 15 minutos para después vaciar los pozos y dejarlos secar. Una vez secos, cada pozo fue teñido con 200µl de cristal violeta de Hucker al 2% y después de 5 minutos se lavaron en agua corriente y se dejaron secar. El material adherido a las paredes de los pozos fue resolubilizado con 160µl de ácido acético glacial y fue leído a 490nm en un lector de microplacas (Modelo BioRad550).

Prueba de dilución en tubo. En tubos de vidrio de 13 x 100 se colocaron 2 ml de CST. A partir de un tubo con una concentración de antibiótico de 100 µg/ml, se realizaron diluciones seriadas a las que se les inoculó 100µl del microorganismo a estudiar, en concentración semejante al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland equivalente a 1.5×10^8 microorganismos en cada tubo y

fue incubado por 24 horas a 37°C, a 180 rpm de agitación. Se determinó la concentración mínima inhibitoria, como la concentración a la que no se presentaba una turbidez en el tubo.

Resistencia de la biopelícula en presencia del antibiótico. Se crecieron los microorganismos en CST en tubos de vidrio, en incubación estática y después de 24 h de incubación, se añadió el antibiótico a las concentraciones utilizadas en la prueba de dilución en tubo. Se incubó una vez más por 24 h y al término de la incubación se determinó la formación de biopelícula por el método cuantitativo.

Producción de biopelícula en presencia del antibiótico. Una vez comprobada la capacidad de producción de biopelícula para cada microorganismo en tubos de 13 x 100 mm con 2.0 ml de CST, se colocaron las diluciones de antibiótico correspondientes, en proporción de 1:2, y 100 µ microorganismo determinado y se incubó por 24 horas a 37°C. Al término de las 24 horas se procedió de igual forma que en la prueba de resistencia de la biopelícula en presencia del antibiótico.

Resultados

Los datos obtenidos con la prueba de sensibilidad en tubo fueron comparados con los enviados por el laboratorio de la Clínica del Parque, con lo que se compro-

Tabla 1. Analisis comparativo de las concentraciones de formacion de biopelícula.

Identificación	Microorganismo	Biofilm (ppm)	Antibiotico	Sensibilidad	CMi (µg/ml)	Bact + Antibiotico	Biofilm + Antibiotico
0426-01	<i>K. pneumoniae</i>	24.22	Amikacina Cefotaxima	(Sensible <=2) (Resistente >=50)	3.125 50	0.3 1.56	1.24 1.43
0425-15,24-7	<i>P. aeruginosa</i>	8.58	Amikacina Cefotaxima	(Resistente >32) (Resistente >=50)	25 50	0.43 1.75	0.97 1.61
0422-61	<i>P. aeruginosa</i>	101.32	Cefuroxima Ampicilina	(Resistente >16) (Resistente >16)	12.5 12.5	4.44 2.5	3.47 3.71
0524-29	<i>A. baumannii</i>	3.98	Cefotaxima Imipenem	(Resistente >32) (Sensible <=4)	50 0.78	0.62 0.32	2.31 2.04
0529-53	<i>A. baumannii</i>	2.63	Cefotaxima Imipenem	(Resistente >32) (Resistente <=4)	50 0.39	0.73 1.2	3.01 0.65
0505-20	<i>A. baumannii</i>	7.26	Cefotaxima Imipenem	(Resistente >32) (Sensible <=4)	50 3.125	0.91 0.54	1.83 1.26
0426-16	<i>S. haemolyticus</i>	6.17	Cefotaxima Vancomicina	(Resistente <32) (Sensible <=2)	50 1.56	1.24 0.43	2.23 2.61
0426-98	<i>P. aeruginosa</i>	12.99	Cefotaxima Amikacina	(Resistente >32) (Resistente <32)	50 50	1.99 0.81	2.12 0.67

bó que la concentración mínima inhibitoria que reportaba el hospital de cada una de las cepas y las que se obtuvieron con este análisis fueron semejantes. Con la prueba de formación de biopelícula, se comprobó que todas las cepas analizadas fueron capaces de formar biopelícula.

Al verificar la capacidad de formación de biopelícula de cada una de las cepas, se utilizó el método de cuantificación con cristal violeta, obteniendo la densidad óptica que se expresó como equivalente de cristal violeta en partes por millón (ppm).⁷ Se demostró la resistencia que pueden tener las bacterias ante los antibióticos cuando estas producen biopelículas (tabla 1).

En la presente investigación se realizaron experimentos en los que se expuso a la bacteria directamente a la acción de los antibióticos, esperando que se formara la biopelícula y pruebas donde ya estaba formada. Se comprobó que la resistencia de la biopelícula, en la mayoría de los casos, fue superior al de la bacteria en estado libre (figura 2).

Se observó que aunque las bacterias analizadas son consideradas como multirresistentes y que en la mayoría de ellas la biopelícula es parte fundamental de esa resistencia, los antibióticos tienen un efecto favorable que inhibe el crecimiento de la biopelícula.

Las bacterias analizadas se reportan en otros estudios con una gran frecuencia en infecciones nosocomiales y con un incremento en la resistencia, por lo que es de importancia la información de la iden-

tificación y sensibilidad antimicrobiana que se debe tener para estudios retrospectivos o bien para comparación prospectiva del patrón de sensibilidad o resistencia predominante.

Conclusión

Muchas de las investigaciones que involucran biopelículas concuerdan que son una de las agrupaciones más resistentes, incluso a la exposición a los antibióticos. En el presente trabajo, los resultados obtenidos demuestran que realmente resultan difíciles de erradicar, sobre todo cuando ya están formadas; sin embargo, no en todos los casos la biopelícula fue la causa principal de la multirresistencia; otros factores, como los plásmidos, pudieron ser la razón principal de la resistencia y la biopelícula participaba de manera indirecta.

Referencias

- AARON, S.D.; W. FERRIS; K. RAMOTAR; K. VANDEMHEEN; F. CHAN y R. SAGINUR: "Single and Combination Antibiotic Susceptibilities of Planktonic, Adherent, and Biofilm-Grown *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Cultured from Sputa of Adults with Cystic Fibrosis", *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 11 (2002), pp. 4172-4179.
- BRET, L.; P. DI MARTINO: "Effect of Ceftriaxone, Amikacin and Ciprofloxacin on Biofilm Formation by Some Enterobacterial Clinical Isolates", *Chemotherapy*, 50, 5 (2004), pp. 255-259.
- COSTERTON, W.; R. VEEH; M. SHIRTLIFF; M. PASMORE; C. POST y G. EHRLICH: "The Application of Biofilm Science to the Study and Control of Chronic Bacterial Infections", *Journal of Clinical Investigation*, 112, 10 (2003), pp. 1466-1477.
- DONLAN, R.M. y J.W. COSTERTON: "Biofilms: Survival Mechanism of Clinically Relevant Microorganisms", *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2 (2002), pp. 167-193.
- KONEMAN, E.W.; S.D. ALLEN; W.M. JANDA; P.C. SCHRECKENBERGER y W.C. WINN: *Diagnóstico microbiológico*, España, Panamericana, 2001.
- PRESCOTT, L.M.; J.P. HARLEY y D.A. KLEIN: *Microbiología*, España, McGraw-Hill/Interamericana, 1999.
- STEPANOVIC, S.; D. VUKOVIC; I. DAKIC; B. SAVIC y M. SVABIC-VLAHOVIC: "A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation", *Journal of Microbiological Methods*, 40 (2000), pp. 175-179.
- STEWART P.S. y J.W. COSTERTON: "Antibiotic Resistance of Bacteria In Biofilms", *The Lancet*, 358 (2001), pp. 135-138.
- STICKLER, D.: "Biofilms", *Opinion in Microbiology*, 2 (1999), pp. 270-275.
- JUÁREZ-VERDAYES, M.A.; M.A. REYES-LÓPEZ; M.E. CANCINO-DÍAZ; S. MUÑOZ-SALAS; S. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ y F.J. ZAVALA-DÍAZ: "Aislamiento, resistencia a vancomicina y producción de biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* desde pacientes con conjuntivitis, úlcera corneal y endoftalmitis", *Latinoam. Microbiol.*, 48, 3-4 (2006), pp. 238-246.
- CHOLE, R.A. y B.T. FADDIS: "Anatomical Evidence of Microbial Biofilms In Tonsillar Tissues", *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 129, 6 (2003), pp. 634-636. ©

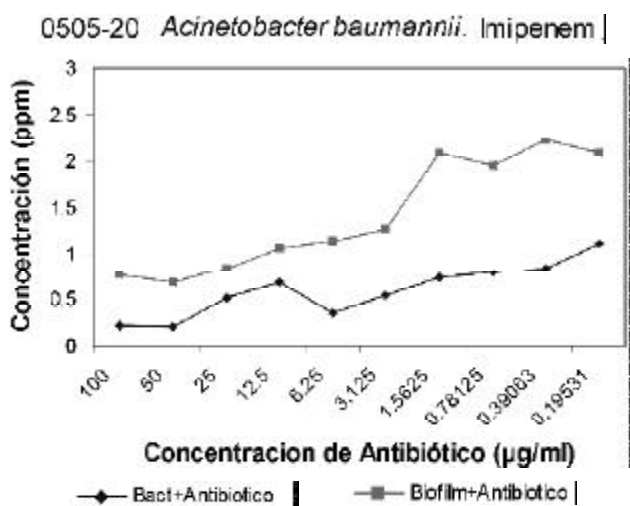


Figura 2. Gráfica de comportamiento de *Acinetobacter baumannii* cuando es expuesta al antibiótico con formación de biopelícula y sin formación biopelícula.