



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

MICROBIOLOGIA

MECANISMOS DE ADHERENCIA DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA A NUEVOS
BIOMATERIALES DE USO MEDICO.

AUTOR: Luis Martínez Martínez

DIRECTORES: Evelio José Perea Pérez

Antonio Torres Rueda

5 de Noviembre de 1988

T.D.
M/96

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda depositada esta Tesis Doctoral
al folio 136 número 65 del libro
correspondiente

Sevilla, 23 SET. 1988

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alena Laffille



MECANISMOS DE ADHERENCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA
A NUEVOS BIOMATERIALES DE USO MEDICO.

[Handwritten flourish]

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositada en Departamento Michelena
de la Fac. de Medicina
de esta Universidad desde el día 5 octubre
hasta el día 30 octubre

Sevilla 30 de octubre de 1988

EL DIRECTOR DE

Antonio Torres

D.ANTONIO TORRES RUEDA, Jefe y Catedrático del
Departamento de Microbiología de la Universidad de
Sevilla:

C E R T I F I C A :

Que Dº LUIS MARTINEZ MARTINEZ, ha realizado la
Tesis Doctoral: "MECANISMOS DE ADHERENCIA DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA A NUEVOS BIOMATERIALES DE USO
MEDICO" bajo la Dirección del Prof.Evelio J. Perea
Pérez, Catedrático del Departamento de Microbiología de
la Universidad de Sevilla.

D. Antonio Torres Rueda.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CATEDRATICO JEFE DEPARTAMENTO

PROF. EVELIO J. PEREA

PROFESORES TITULARES

M.^a VICTORIA BOROBIO

JOSE C. PALOMARES

JAVIER AZNAR

Prof. Evelio J. Perea, Catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla:

C E R T I F I C A :

Que D^o LUIS MARTINEZ MARTINEZ, ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada "MECANISMOS DE ADHERENCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA A NUEVOS BIOMATERIALES DE USO MEDICO"

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Sevilla a veintiseis de julio de mil novecientos ochenta y ocho.

Fdo.: Prof. E.J. Perea

A Ma del Rosario

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Evelio J. Perea por su dedicación en la dirección de esta Tesis, por sus indicaciones y sus consejos desde el inicio de este trabajo, gracias a los cuales éste ha podido alcanzar su conclusión.

Al Dr. Alvaro Pascual cuya experiencia y ayuda, día tras día, me han resultado de un valor incalculable para desarrollar y conseguir los objetivos de este trabajo.

A la Dra. Milagrosa Díaz quien amablemente puso a mi disposición el material necesario para el recuento isotópico de las muestras.

Al Dr. Jesús Ambrosiani y a D. Cándido Mosquero por el tiempo que me han dedicado en el estudio con Microscopía Electrónica de Barrido.

A mis compañeros de la Unidad de Mecanismos de Defensa del Huésped de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina de Sevilla, y a todo el personal de la misma y del Departamento de Microbiología del Hospital Universitario de Sevilla, que siempre supieron animarme y prestarme su ayuda desinteresada.

A la St^a Matilde Monge que amablemente mecanografió, hasta su forma definitiva, este trabajo, y a D. Santiago Martínez que realizó los esquemas y gráficos del mismo.

A todos los que de una u otra forma me han ayudado a conseguir llegar a este punto.

Mi más profundo agradecimiento para ellos.

INDICE

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION	2
MATERIAL	18
I. CEPAS	18
II. CATETERES	18
III. MEDIOS DE CULTIVO	19
IV. SOLUCIONES TAMPON	20
V. SUERO HUMANO	20
VI. ANTIMICROBIANOS	21
VII. MATERIAL PARA ESTUDIO RADIOACTIVO	21
VIII. MATERIAL ESPECIAL PARA MICROSCOPIA ELECTRO-	
NICA DE BARRIDO	23
IX. COMPUESTOS QUIMICOS	23
X. INSTRUMENTAL Y MATERIAL VARIO	24
METODOS	27
IDENTIFICACION	27
SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	29
HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE	30
DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE SUSTANCIA MU-	
COIDE ("SLIME")	31
ADHERENCIA A POLIESTIRENO	32
Sustrato sólido	32
Inóculo	32
Suero humano	33
Metodología de ensayo	33
ADHERENCIA A CATETERES	35

ESTUDIO DE LA ADHERENCIA DE <u>P.AERUGINOSA</u> A BIOMATERIALES CON MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO	38
EFFECTO DEL BIOMATERIAL EN LA SUPERVIVENCIA DE <u>P.AERUGINOSA</u>	38
ESTUDIO ESTADISTICO	42
RESULTADOS	44
IDENTIFICACION Y SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS	44
HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE	46
DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE SUSTANCIA MUCOIDE ("SLIME")	46
ADHERENCIA A POLIESTIRENO	49
ADHERENCIA A CATETERES	53
Adherencia a cloruro de polivinilo	53
Adherencia a poliuretano	61
Adherencia de las variantes mucoide y no mucoide de una misma cepa	65
Adherencia a látex siliconizado	66
EFFECTO DEL BIOMATERIAL EN LA SUPERVIVENCIA DE <u>P.AERUGINOSA</u>	75
DISCUSION	82
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFIA	107

INTRODUCCION



En 1882 Gessard (1) aisló por primera vez Pseudomonas aeruginosa (Bacillus pyoceaneus) de muestras procedentes de heridas quirúrgicas. Hasta 1947 sólo se conocían 91 casos de bacteriemia por este microorganismo (2), pero en la década actual, cien años después de su descripción, P.aeruginosa ha pasado a ser un microorganismo de creciente interés en patología humana debido a su estrecha relación con enfermos inmunodeprimidos y hospitalizados (3), su resistencia a muchos antimicrobianos (4) y la alta relación mortalidad/incidencia en muchas infecciones, en ciertos casos superior al 90% (5).

El género Pseudomonas está incluido en la familia Pseudomonadaceae e incluye bacilos gram negativos de 1-3 x 0.5-1 micras, rectos o ligeramente incurvados, móviles, aerobios (si bien, a veces, arginina y nitrato pueden permitir el crecimiento anaerobio), productores

de catalasa y con frecuencia de oxidasa. Son microorganismos de vida libre; algunas especies son patógenas para el hombre, los animales o las plantas (6, 7, 8).

La especie de mayor importancia en Microbiología Médica es P.aeruginosa. Esta bacteria en medios sólidos habituales origina tres principales tipos de colonias: lisas, rugosas (ambas no mucoides) y mucoides, estas últimas en cultivos de secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística (9, 10) y sólo ocasionalmente en otras circunstancias (9, 10, 11).

La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero este puede tener lugar entre 20°C y 42°C; sus requerimientos nutritivos son sencillos, siendo capaz de metabolizar una gran variedad de sustancias orgánicas. Ello permite al microorganismo sobrevivir, y aun multiplicarse, en líquidos y ambientes húmedos muy diversos.

La proporción de población general portadora de P.aeruginosa en el tracto gastrointestinal y en piel/mucosas es baja, pero la administración de antimicrobianos (pacientes hospitalizados) aumenta el porcentaje de portadores (12).

La transmisión persona-persona parece ser el modo más importante de diseminación del microorganismo. La importancia que los reservorios hospitalarios (fregaderos, respiradores, desinfectantes líquidos,...) y los alimentos juegan en la transmisión intrahospitalaria del microorganismo también debe tenerse en cuenta (12, 13). De hecho, en la actualidad, P.aeruginosa debe considerarse como una bacteria especialmente relacionada con la infección nosocomial,

siendo responsable de casi la décima parte de todas las infecciones hospitalarias y de la mitad de las epidemias nosocomiales (12), sobre todo en casos de infecciones de heridas y quemaduras, infecciones del tracto respiratorio e infecciones del tracto urinario.

P.aeruginosa es resistente a muchos antimicrobianos. Hasta 1963 sólo la polimixina B y la colistina eran relativamente útiles en el tratamiento de infecciones por este microorganismo. En esa fecha apareció la gentamicina; algunos años después lo hizo la primera penicilina anti-Pseudomonas: la carbenicilina. La incorporación al arsenal terapéutico de nuevos aminoglucósidos (tobramicina, ampicacina, netilmicina,...) betalactámicos (piperacilina, azlocilina, cefsulodina, ceftazidima, ceftizoxima, imipenema,...) y quinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina,...) ha aumentado las posibilidades terapéuticas frente a este microorganismo. La resistencia a los antimicrobianos depende en buena medida de la incapacidad de muchos de ellos para atravesar la membrana externa de P.aeruginosa, pero también de la producción de enzimas inactivantes (tanto de betalactámicos como de aminoglucósidos).

El papel de las defensas del huésped es crucial frente a las infecciones por P.aeruginosa. De todos los factores asociados a la infección por P.aeruginosa (Tabla 1), el más importante es la existencia de neutropenia, al ser la fagocitosis el principal mecanismo de defensa frente a este microorganismo. Las infecciones por P.aeruginosa ocurren con poca frecuencia en individuos con estado inmunitario normal, en cambio, en pacientes inmunodeprimidos, aun a pesar del empleo de antimicrobianos activos "in vitro" la mortalidad es elevada.

TABLA 1. Factores predisponentes a la infección por P.aeruginosa (3, 7, 12).

Neutropenia

Enfermedades metabólicas: Diabetes mellitus

Enfermedades hematológicas

Cáncer

Transplante de órganos

Quemaduras

Instrumentalización:

Cateterización uretral

Traqueotomía

Punción lumbar

Infusiones intravenosas

Fibrosis quística

Tratamiento con agentes inmunosupresores:

Corticoides

Antimetabolitos

Radiación

Tratamiento antimicrobiano previo

Drogadicción intravenosa

Uso de lentes de contacto

Las cepas P.aeruginosa, tanto las productoras de bacteriemia, como las aisladas de piel, tracto gastrointestinal y mucosas, no asociadas con enfermedad, son por lo común resistentes a la acción bactericida del suero (14). Los anticuerpos naturales anti-Pseudomonas, esencialmente del tipo IgM (15), poseen una capacidad opsonizante poco eficaz (16); el sistema complemento, en cambio, sí tiene una gran capacidad de opsonización (17, 18), potenciada por los anticuerpos específicos (mayoritariamente IgG) que aparecen tanto en animales inmunizados como en enfermos convalecientes (14).

Se ha demostrado también la existencia de fagocitosis independiente de opsoninas, probablemente por la existencia de pili, estructuras de dominios altamente hidrófobos (19).

En la actualidad existe muy poca información sobre el papel que la inmunidad celular juega en la defensa frente a P.aeruginosa.

En sistemas acuáticos naturales, P.aeruginosa crece formando biocapas, constituidas por microcolonias continuas (20, 21, 22). En principio, los microorganismos, como células aisladas, se dividen y crecen en una matriz de exopolisacáridos denominada glicocalix o "slime", constituyendo microcolonias que finalmente originan biocapas coherentes. Una vez constituidas las biocapas, se liberan células capaces de colonizar otras superficies y formar así nuevas microcolonias.

El material que constituye el "slime" es un exopolisacárido compuesto por una matriz de alginato altamente hidratada (99% de agua). El alginato es un

polímero aniónico de ácido gulurónico y ácido manurónico, ambos con sustituciones por grupos acetato o piruvato (23). Las moléculas se disponen en forma de cadenas lineales que irradian desde la superficie externa de la bacteria. A lo largo de la estructura de alginato los ácidos manurónico y gulurónico se disponen en dominios de uno u otro; la proporción de cada uno y la sustitución O-acetil varía según las cepas, siendo posible establecer diferencias inmunológicas (24, 25).

El subcultivo repetido en agar de Mueller Hinton (22) o en caldo nutritivo (26) de una cepa mucóide en su primer aislamiento determina la aparición rápida de variantes no mucóides. Por el contrario, la incorporación a los medios de cultivo de antimicrobianos (26), surfactantes (27), o concentraciones adecuadas de Mg^{2+} y gluconato (25) favorecen la estabilidad de las formas mucóides, como también sucede cuando el cultivo se realiza con agitación (28).

Clásicamente se ha venido aceptando que la producción de "slime" es un fenómeno característico de las cepas mucóides pero en un trabajo reciente (29) se ha puesto de manifiesto que tanto variantes no mucóides obtenidas por subcultivo de cepas mucóides, como cepas no mucóides desde un principio también producen "slime". Ello ha llevado a considerar que la producción de exopolisacárido es una propiedad común a todas las cepas de P.aeruginosa, y que es la cantidad producida del mismo lo que realmente varía.

La carga negativa del "slime" hace que este actúe como una resina de intercambio iónico capaz de absorber materiales que P.aeruginosa utiliza en su nutrición, al tiempo que protege al microorganismo de factores ambientales adversos, como anticuerpos (30-33), PMN (32, 34, 35), y antimicrobianos (36, 37). El núcleo de

ácidos urónicos y los grupos O-acetil están implicados en la capacidad de eliminación de radicales hipoclorito producidos por PMN activados (38). Experimentalmente también se ha demostrado que el "slime" inhibe la movilidad, la endocitosis y la formación de fagosomas (35). La actividad de intercambio iónico determina que antes de que determinados antimicrobianos puedan alcanzar el interior de P.aeruginosa, debe producirse una saturación del "slime", por ello los antimicrobianos con menor carga positiva son los que más fácilmente podrán alcanzar el interior de la célula. El "slime" está también implicado en los procesos de adherencia de P.aeruginosa a células del tracto respiratorio superior (39) y a dispositivos de uso médico (20, 25, 40-42).

El desarrollo de un cuadro infeccioso requiere una colonización previa por el correspondiente agente etiológico, cuyo primer paso será la adherencia del microorganismo a una superficie del huésped parasitado (43).

Los estudios sobre adherencia bacteriana se iniciaron por Guyot, en 1908, estudiando la hemaglutinación producida por microorganismos (44); a partir de la década de los 50 (45-47) se centraron en la interacción bacterias-células, y han alcanzado su auge en la última década, tras haberse sugerido la importancia patogénica de estos fenómenos en las enfermedades infecciosas (48). A estos estudios han venido a sumarse los de microbiólogos marinos sobre la importancia de la colonización bacteriana de corrientes marinas (49).

Se viene aceptando que en la interacción bacterias-biomateriales existe un primer paso en el que se vencen fuerzas de naturaleza física (electrostáticas, hidrofóbicas,...) y de otro, irreversible, mediado

por las interacciones de polímeros exopolisacáridos con la superficie del biomaterial.

De acuerdo con la teoría de Derjaguin-Landau/Verwey-Overveek (Teoría DLVO) (50) (sobre las interacciones entre objetos sumergidos en un líquido y las partículas en suspensión que existen en el mismo) una serie de fuerzas inespecíficas (gravidad, quimiotaxis, fuerzas de atracción de London-Van der Waals, atracción electrostática, tensión superficial) atraen partículas, mientras que otras (fuerzas de repulsión de London-Van der Waals, fuerzas de repulsión por obstáculo estérico, repulsión electrostática) las repelen. Como consecuencia del efecto conjunto una determinada partícula puede ocupar una posición inmediatamente externa a la superficie en un fenómeno conocido como adsorción; si las partículas logran vencer suficientemente las fuerzas de repulsión, quedarán ligadas a la superficie gracias a la acción de fuerzas de mayor intensidad (enlace covalente, puentes de hidrógeno, enlace iónico, hidrofobicidad) sobreviniendo lo que es ya conocido como adherencia. Algunos autores (50) describen también un tercer estadio de colonización microbiana al que se conoce como coagregación, en el que los microorganismos, según los principios ya expuestos, se unen a otros que previamente han colonizado una superficie sólida.

La hidrofobicidad de superficie y la carga eléctrica de superficie de las bacterias han sido los parámetros más estudiados de cuantos están implicados en estas interacciones iniciales (49, 51-53). En un medio acuoso la hidrofobicidad de superficie de un microorganismo favorece su asociación estrecha a un sustrato hidrófobo (49); de esta forma los microorganismos con superficie hidrófoba se unen más a células animales que los hidrófilos (54, 55). Hay un gran

número de circunstancias que influyen en la expresión de esta propiedad tales como el medio empleado para el cultivo, el crecimiento en reposo o en agitación, la realización de subcultivos repetidos y la fase y la temperatura de crecimiento; estos factores indirectamente, por tanto, pueden influir modulando la adherencia bacteriana.

En cualquier caso la teoría DLVO sólo es una ayuda relativamente útil para comprender el fenómeno de la colonización en el ser vivo, donde una serie de factores adicionales como enzimas, anticuerpos e incluso antimicrobianos pueden alterar las interacciones entre bacterias y superficies.

En la actualidad prácticamente cualquier persona llevará a lo largo de su vida algún dispositivo médico. Una de las complicaciones más serias que se derivan del empleo de estos dispositivos es la aparición de infecciones (56, 57).

Los dispositivos de uso médico como catéteres, sondas... de los que el médico ha podido disponer en el mercado se han fabricado con diferentes materiales sintéticos (58). En principio se usaron materiales que resultaron tener una elevada capacidad trombogénica o eran demasiado rígidos: polietileno, polipropileno, cloruro de polivinilo (PVC), nylon. Más tarde se han introducido los fluorocarbonos (Teflon), más hemocompatibles pero relativamente inelásticos. También se ha empleado el PVC con factores que permiten su ablandamiento (plastificantes como éster ftálico y otros aditivos) pero en concentraciones excesivamente altas, incluso del 50%, con el peligro de que estas sustancias añadidas al polímero base pueden liberarse con cierta facilidad ocasionando efectos tóxicos en el

organismo (59-61). Otro biomaterial de uso extendido es la silicona; esta sustancia posee una baja tensión superficial, es fuertemente hidrófoba pero demasiado blanda y mecánicamente débil por lo que se ha empleado casi sólo para fabricación de catéteres venosos centrales de pared gruesa que requieren largo tiempo de implantación y para el recubrimiento de otros biomateriales.

En la actualidad se están introduciendo los poliuretanos, materiales con un número de propiedades que los hacen muy adecuados para la fabricación de cánulas y catéteres: buena hemocompatibilidad; son suficientemente rígidos para su inserción pero sufren en el interior de las venas un reblandecimiento, lo que conlleva una disminución de la irritación vascular y del desarrollo de flebitis; tienen una excelente combinación de velocidad de flujo/rigidez/resistencia a la torsión; buena radioopacidad y mayor facilidad para humedecer su superficie que PVC, silicona.., por lo que sus paredes podrían recubrirse con soluciones que contengan lubricantes, anticoagulantes, antimicrobianos... Algunos de los poliuretanos más modernos están, teóricamente al menos, libres de aditivos al sintetizarse mediante un proceso de polimerización en el que no se requieren catalizadores.

Los estudios realizados sobre la adherencia bacteriana a catéteres (41, 62-68) y a otros dispositivos de empleo clínico como prótesis articulares (69, 70) y lentes de contacto (40, 42, 71), señalan la existencia de diferencias dependientes tanto del microorganismo como del biomaterial considerado. La mayoría de estos trabajos se han realizado con Staphylococcus (especialmente estafilococos coagulasa negativa) (37, 40, 62-68), Enterobacteriaceae (Escherichia coli, Serratia marcescens,..) (37, 65, 66) y

P.aeruginosa (40, 42, 62, 71). La especial capacidad de P.aeruginosa para colonizar superficies inertes, asociada a la producción in situ de "slime", la convierten en uno de los microorganismos de mayor interés en este tipo de cuadros infecciosos. Los estudios realizados hasta la fecha sobre la adherencia de P.aeruginosa a biomateriales han sido puramente morfológicos (62, 71), utilizando microscopía electrónica de barrido, pero se carece aún de estudios sobre la cinética de esta interacción y de la posible modulación de la misma.

Algunos estudios parecen indicar que Staphylococcus puede utilizar los materiales de catéteres intravenosos para multiplicarse en medios sin nutrientes convencionales (63, 72). Este extremo parece en principio de gran interés y tampoco ha sido evaluado hasta la fecha en relación con P.aeruginosa.

Otro de los aspectos que recientemente se están analizando en detalle es la acción que las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos ejercen sobre la adherencia de los microorganismos (73). Se han reconocido diversos mecanismos de acción para las concentraciones subinhibitorias: modificación de la forma bacteriana (74-76), inhibición de la síntesis de adhesinas (76, 77) e inducción de la síntesis de adhesinas funcionalmente deficientes (78). Normalmente estas alteraciones producen una disminución de la adherencia; pero se conocen casos en que pueden aumentarla (77, 79, 80). La mayoría de estos estudios han sido realizados en la interacción bacteria-superficie celular, pero hay muy pocos referidos a la interacción con biopolímeros de uso médico (77).

Una vez que se ha producido la colonización de una superficie, el tratamiento antibacteriano se hace mucho

más problemático hasta el punto que en la mayoría de las situaciones se hace necesario eliminar el biomaterial quirúrgicamente para poder controlar la infección.

Se ha comprobado que vancomicina no inhibe el crecimiento de cepas de Staphylococcus epidermidis, sensibles "in vitro", cuando se encuentran en las biocapas formadas sobre una superficie sólida, ni a las bacterias de la fase líquida donde dicha superficie se halla sumergida; tanto las bacterias adheridas como las libres tienen valores de CMB altísimos, mucho mayores que cuando crecen en medios convencionales, pudiendo considerarse tolerantes a este antimicrobiano (81).

También se ha comprobado que la tobramicina no posee acción bactericida sobre P.aeruginosa asociada a biomateriales, esta acción no llega a conseguirse ni aun con el empleo de concentraciones 50 veces superiores a la CMB que tienen las bacterias libres en la fase líquida donde se encuentra sumergido el biomaterial (82); se desconoce si este mismo fenómeno tendrá lugar con otros antimicrobianos, pero de hecho, hasta ahora, carecemos de sustancias eficaces para la lucha antibacteriana en este tipo de situaciones.

Los datos expuestos permiten aclarar situaciones clínicas en principio paradójicas: se sabe que con frecuencia la administración de un antimicrobiano activo in vitro no se sigue de la correspondiente y deseable mejoría del paciente; presumiblemente el antimicrobiano es activo frente a los microorganismos libres en fases líquidas pero no frente a aquellos que están colonizando una superficie del huésped. Cuando el tratamiento se suspende al cabo de un tiempo las biocapas de las zonas colonizadas permiten la liberación de nuevos microorganismos, lo que ocasiona una recaída en el proceso. Es evidente, por tanto, la

necesidad de profundizar en los conocimientos de este tipo de interacciones a fin de lograr una lucha eficaz frente a las mismas.

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas decidimos realizar este trabajo, con objeto de estudiar la adherencia de P.aeruginosa a distintos biomateriales y el efecto de los mismos en la viabilidad del microorganismo. Para ello hemos incluido cepas no mucoides y cepas mucoides estudiando su interacción con un polímero hidrófobo, el poliestireno, y con varios biopolímeros de uso médico: cloruro de polivinilo, poliuretano y látex siliconizado. Decidimos estudiar la importancia de la hidrofobicidad de superficie y la producción de "slime" en este proceso y cual era la acción moduladora que sobre el mismo ejercen concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos. Para obtener información morfológica del proceso de adherencia se incluyó en el estudio la observación de los catéteres a los que se había adherido P.aeruginosa con microscopía electrónica de barrido.

Para todo ello establecimos los siguientes objetivos:

1. Aislamiento, identificación y determinación de la sensibilidad a seis antimicrobianos (amicacina, ceftazidima, imipenema, ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina) de seis cepas no mucoides y tres cepas mucoides de P.aeruginosa. Obtención de una variante no mucosida de una de las cepas mucoides.

2. Determinación de la hidrofobicidad de superficie de las nueve cepas tras su crecimiento en reposo y en agitación. Valores de la hidrofobicidad de superficie de nuestras cepas en presencia de sulfato amónico. Variaciones de los valores de hidrofobicidad

de superficie cuando las cepas fueron preincubadas en suero humano y en concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos considerados.

3. Estudio de la producción de "slime" en nuestras cepas.

4. Adherencia de cepas hidrófilas e hidrófobas a un polímero hidrófobo, poliestireno. Modulación de la misma por la preincubación en suero humano y por el pretratamiento bacteriano con concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos.

5. Estudio de la cinética de adherencia de nuestras cepas a tres biopolímeros (cloruro de polivinilo, poliuretano y látex siliconizado), empleando para ello catéteres intravasculares y peritoneales y sondas urinarias de uso habitual en el medio hospitalario. Cinética de la adherencia de una variante no mucoide procedente de una cepa mucoide a estos biomateriales. Adherencia comparativa a dos catéteres con igual polímero base (cloruro de polivinilo) de diferente procedencia comercial.

6. Modulación de la adherencia de P.aeruginosa por la preincubación bacteriana en concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos.

7. Estudio con técnicas de microscopía electrónica de barrido de las interacciones entre P.aeruginosa y los diferentes biomateriales considerados.

8. Estudio del efecto que la presencia de biomateriales tiene en la viabilidad de P.aeruginosa en suspensión.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

I. CEPAS.

Se han estudiado nueve cepas de P.aeruginosa, procedentes de muestras clínicas de pacientes del Hospital Universitario de Sevilla. Las cepas 1 y 5 se obtuvieron de un exudado de herida, la cepa 2 de hemocultivo, la 3 de un exudado faríngeo, la 4 de un aspirado bronquial, la 6 de orina y las cepas 7,8 y 9 de esputo de pacientes con fibrosis quística. De la cepa 9 se obtuvo una variante no mucóide como se explica en el apartado de métodos.

II. CATETERES.

Se han empleado cuatro tipos de catéteres, de uso en nuestro Hospital, cuyas características se detallan a continuación:

1. Catéter de Cloruro de Polivinilo (PVC, Polyvinyle Chloride): Argyle 3.5 (Izasa, España). Catéter umbilical para neonato. (PVC-1)
Diámetro externo: 1.2 mm
Diámetro interno: 0.8 mm
Superficie total expuesta (superficie lateral externa+superficie lateral interna+superficie de ambas coronas basales de un segmento de 1.0 cm de longitud): 0.641 cm².

2. Catéter de poliuretano: Cavafix Certo (Palex, España). Catéter venoso periférico (PUT).
Diámetro externo: 1.7 mm
Diámetro interno: 1.1 mm
Superficie total expuesta 0.906 cm².

3. Catéter de látex-siliconizado: Pediatric Foley Catheter Two ways (Izasa, España). Catéter de vías urinarias (LS).
Diámetro externo: 2.8 mm
Diámetros internos: 0.9 y 0.4 mms
Superficie total expuesta: 1.396 cm².

4. Catéter de Cloruro de Polivinilo: Stylet-Catheter (Palex, España). Catéter peritoneal (PVC-2).
Diámetro externo: 2.7 mm
Diámetro interno: 1.5 mm
Superficie total expuesta: 1.399 cm².

Los catéteres se cortaron en segmentos de 1.0 cm de longitud en condiciones estériles, en el interior de una cabina de flujo laminar.

III. MEDIOS DE CULTIVO.

1. Caldo de soja tripticasa (Tryptic soy broth, TSB)

(Difco, USA).

Digerido pancreático de caseína	17	gr.
Digerido pancreático de semilla de soja	3	gr.
Glucosa	2,5	gr.
Fosfato dipotásico.....	2,5	gr.
Cloruro sódico	5	gr.
Agua desmineralizada	1.000	c.c.

2. Agar soja tripticasa (Tryptic soy agar, TSA).

A los componentes del TSB se añaden, por litro, 15 gr de agar (Bacto-agar, Difco, USA).

Cuando se requiere se añade sangre humana al 10%.

El medio se dispensa en placas estériles (20 ml/placa).

IV. SOLUCIONES TAMPON.

1. Tampón fosfato salino (Phosphate buffered saline, PBS).

Fosfato monopotásico	144	mg.
Cloruro sódico	8.500	mg.
Fosfato disódico	795	mg.
Agua desmineralizada	1.000	cc.
pH	7.2-7.4	

V. SUERO HUMANO.

Se ha usado una mezcla de 10 sueros obtenidos de voluntarios humanos sanos.

El total de la mezcla fue distribuido en alícuotas de 0,5 ml en viales de polipropileno, congeladas a -70°C y mantenidas así hasta el momento de su uso, en el que se descongelaron las necesarias para cada ensayo.

VI. ANTIMICROBIANOS.

Se han empleado seis antimicrobianos: amicacina (AK), ceftazidima (CZ), imipenema (IM), ciprofloxacina (CF), ofloxacina (OF), y norfloxacina (NF).

Hemos usado polvo valorado de los diferentes antimicrobianos, que fue pesado en balanza de precisión; en cada caso se emplearon los solventes recomendados (Tabla 2) para obtener soluciones madres que se almacenaron en alícuotas de 0.5 ml a -70°C en viales de polipropileno. Posteriormente y cuando hubo de emplearse cada antimicrobiano se usaron los diluyentes adecuados hasta conseguir las soluciones de trabajo deseadas.

VII. MATERIAL PARA ESTUDIO RADIATIVO.

1. Isótopo: 2- H^3 -Adenina, actividad específica 24 Ci/mmol. (Amersham, UK).
2. Líquido de centelleo con solvente orgánico especial para soluciones acuosas: Cumene (AquaLuma Plus, Lumac, The Netherlands).

TABLA 2. ANTIMICROBIANOS USADOS

ANTIMICROBIANO	CASA SUMINISTRADORA	SOLVENTE	DILUYENTE	SOLUCION MADRE (mg/l)
Amicacina	Bristol Myers Sae	Agua destilada	Agua destilada	1024
Ceftazidima	Glaxo	1	"	1024
Imipenema	Merck Sharp & Dhome	Agua destilada	"	1024
Ciprofloxacina	Bayer	Agua destilada	"	1280
Ofloxacina	Hoechst	2	"	1280
Norfloxacina	Merck Sharp & Dhome	NaOH 0.01N	"	1280.

1: Carbonato sódico en agua destilada; el peso del carbonato sódico fue un 10% del de ceftazidima (102.4 mg/litro).

2: Hidróxido sódico 0.1N (3%) + Acido clorhídrico 0.1N (3%) + Agua destilada (94%).

VIII. MATERIAL ESPECIAL PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

1. Fijador de Palay:

Paraformaldehido 2.5%*	200 ml.
Glutaraldehido 25%	20 ml.
Tampón fosfato	150 ml.
Cloruro cálcico 0.5%	2 ml.
Agua desmineralizada	Completar hasta 500 ml.

Usar tras filtración.

- | | |
|----------------------------|------------|
| *Paraformaldehido | 5 gr. |
| Agua desmineralizada | 200 ml. |
| Hidróxido sódico 1N | 5-7 gotas. |

Calentar 200 ml. de agua desmineralizada a 90°C, añadir el paraformaldehido agitando constantemente; añadir hidróxido sódico 1N hasta que la solución esté clara, sin precipitados. Usar frío para preparar fijador de Palay.

IX. COMPUESTOS QUIMICOS.

1. Acido clorhídrico 35% (Panreac, España).
2. Carbonato sódico (Merck, RFA).
3. Cloruro cálcico (Merck, RFA).
4. Etanol 100° (Scharlav, RFA).
5. Fosfato disódico (Merck, RFA)
6. Fosfato monopotásico (Merck, RFA).
7. Glicerol (Panreac, España).
8. Glutaraldehido (Merck, RFA).
9. Hidróxido sódico (Merck, RFA).

10. Paraformaldehido (Merck, RFA).
11. p-xileno (Merck, RFA).
12. Safranina (Merck, RFA).

X. INSTRUMENTAL Y MATERIAL VARIO.

1. Agitador orbital: Gallenkamp (UK).
2. Agitador de tubos: Reax 2.000 Heidolph (Selecta, España).
3. Balanza de precisión: Mettler H51AR (Mettler, Switzerland).
4. Baño de agitación: Unitronic 320 OR (Selecta, España).
5. Centrífuga: TJ-6 Centrifuge (Beckman, USA).
6. Congelador de -70°C: Forma Bio-Freezer (Forma Scientific, USA).
7. Contador de radiaciones beta de líquido de centelleo: Wallac 1210 Ultrobeta (LKB, Sweden).
8. Espectrofotómetro: Spectronic 501 (Bausch & Lomb, USA).
9. Estufa de incubación: Memert 30°-120°C (Schwabach, RDA).
10. Frascos de vidrio de 20.0 ml, con tapón a rosca (Flow, USA).
11. Micropipeta de 8 canales para dispensar 50 microlitros: LP Italiana Pippette (Labsystems, Finland).
12. Micropipetas para dispensar 5 microlitros a 1.000 microlitros: LP Italiana Pippette (Labsystems, Finland).
13. Microscopio electrónico de barrido: ISI-SX-25 (ISI, Japan).
14. pHmetro: pHmeter 125 (Corning, USA).
15. Placas de cultivo tisular de 24 pocillos, 2 cm²/pocillo (Costar, USA).
16. Placas de microdilución de fondo en U, estériles (Greiner, RFA).

17. Tubo de secado de punto crítico de CO₂: Mattered Polaron tube (Polaron, UK).
18. Tubos de vidrio de 15.0 ml, con tapón a rosca (Flow, USA).
19. Unidad metalizadora para microscopía electrónica de barrido: PSB-Phoeting Unit (Polaron, UK).
20. Viales de polipropileno: Biovial (Beckman, USA).

METODOS

IDENTIFICACION.

Los aislamientos iniciales se realizaron en agar sangre (agar base nutritivo más sangre humana al 10%); los microorganismos fueron identificados como bacilos gram negativos, oxidasa positiva, catalasa positiva, no fermentadores de la glucosa, metabolizadores de glucosa por vía oxidativa, móviles y con crecimiento a 42°C; todas las cepas fueron hemolíticas, 8 producían pioverdina y la restante (cepa 9) piorrubrina; estos criterios permitieron determinar que se trataba de P.aeruginosa (7).

Las cepas fueron mantenidas congeladas en alícuotas en leche descremada a -20°C.

Al comenzar este estudio las cepas se descongelaron a temperatura ambiente, se inocularon alícuotas en TSB, 6 horas, 37°C; a partir de este

primer subcultivo se sembraron varias placas por cepa de TSA con sangre humana al 10%, que se incubaron a 37°C durante 18 horas. Del crecimiento obtenido se sembraron densamente en TSB-glicerol (10:1, v/v) alícuotas de cada una de las cepas, que fueron congeladas a -70°C hasta el momento de su empleo. Para cada uno de los sucesivos ensayos se descongeló una de estas alícuotas.

El biotipo de cada cepa se estableció mediante las siguientes reacciones enzimáticas y metabólicas:

- Nitrato reductasa.
- Nitrito reductasa.
- Producción de indol.
- Fermentación de la glucosa.
- Arginina dehidrolasa.
- Ureasa.
- Hidrólisis de la esculina.
- Gelatinasa.
- Beta-galactosidasa.
- Asimilación de glucosa.
- " " arabinosa.
- " " manosa.
- " " N-acetil-glucosamina.
- " " maltosa.
- " " gluconato.
- " " caprato.
- " " adipato.
- " " malato.
- " " citrato.
- " " fenil-acetato.
- Citocromo oxidasa.

Para ello se utilizó el sistema API 20NE, (API System SA, France), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Para la obtención de una variante no mucóide a partir de la cepa 9 (mucóide originalmente), se sembró esta en 5 ml. de TSB (37°C, 20 h, en reposo) subcultivándose posteriormente 10 µl. de este caldo en una placa de TSA; se incubó esta placa (37°C, 48 h) apareciendo variantes mucóides y no mucóides; estas últimas se seleccionaron subcultivándolas de nuevo en TSA hasta obtener un cultivo puro, libre de variantes mucóides; se realizaron 5 subcultivos más de esta variante comprobándose que no se produjo la reversión hacia la forma mucóide. Tras ello se congelaron alícuotas con la metodología antes señalada.

SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los distintos antimicrobianos para nuestras cepas se ha realizado mediante la técnica de microdilución (83) empleando TSB. Se han usado placas de microdilución estériles de 96 pocillos con fondo en U. El rango de diluciones (en base 2) fue 256 a 0.25 mg/l para ampicilina y ceftazidima, 64 a 0.06 mg/l para imipenem y 16 a 0.0015 mg/l para ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina. El inóculo usado fue de 5×10^5 UFC/ml y como control se usó P.aeruginosa ATCC 27853.

Tras incubación de las placas durante 18 horas a 37°C se definió la CMI como la menor concentración de antimicrobiano que inhibió el crecimiento del microorganismo. La concentración mínima bactericida (CMB) se calculó subcultivando 100 µl. de cada uno de los pocillos sin crecimiento y del primero con crecimiento en placas de TSA-sangre. La CMB fue definida como la menor concentración de antimicrobiano



que determinó la muerte del 99.9% de las bacterias inoculadas.

HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE.

Se realizó mediante la técnica de Rosenberg y cols. (84): Se inocularon 2-3 colonias de la cepa a estudiar en tubos con 10 ml de TSB durante 18 horas a 37°C; se realizó un experimento realizando la incubación de los tubos en reposo y otro incubándolos en agitación.

Se centrifugaron los tubos (3000 rpm, 15 min, 4°C) y se lavó el sedimento 3 veces con PBS frío. El botón final se resuspendió nuevamente en PBS y se prepararon 3.0 ml de una suspensión que alcanzó por espectrofotometría, a 520 nm, una absorbancia de 0.685 ± 0.005 (absorbancia inicial) equivalente aproximadamente a 10^9 UFC/ml, cifra que fue comprobada mediante recuento en placa. Se pusieron estos 3.0 ml, en un tubo de vidrio de 1 cm de diámetro interno, se añadieron 0.25 ml de p-xileno y se agitó el tubo durante 60 segundos. Tras 30 minutos de separación de fases (PBS/p-xileno) se retiró la fase acuosa con pipeta (sin arrastrar parte alguna de la capa p-xileno) y se midió la absorbancia de la misma. La hidrofobicidad de superficie (HS) se expresó como porcentaje según la siguiente fórmula:

$$HS = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia tras separación de fases}}{\text{Absorbancia inicial}}\right) \times 100\%$$

Rosenberg (85) ha descrito un aumento de los valores de HS en E.coli cuando se realiza la determinación tras añadir sulfato amónico a la fase acuosa. Siguiendo la metodología indicada por este

autor, y para evaluar este posible efecto, se añadieron 1.5 ml. de sulfato amónico a la suspensión inicial de 10^9 UFC/ml. antes de poner los 0.25 ml. de p-xileno. Posteriormente se siguió el procedimiento antes indicado y se anotó el valor de HS.

Con la misma metodología se midió la HS de las cepas pretratadas con $1/4$ x CMI de los seis antimicrobianos. A tal fin las bacterias crecieron en TSB conteniendo las correspondientes concentraciones de antimicrobianos, durante 18 horas a 37°C .

Para dos cepas (cepas 3 y 6) con valores límites de hidrofobicidad se determinó la HS de las bacterias preincubadas (15 minutos, 37°C , en agitación) en suero al 1% y al 10%.

DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE SUSTANCIA MUCOIDE ("SLIME").

La determinación de la producción de "slime" por las nueve cepas de P.aeruginosa se realizó mediante la técnica de Christensen y cols. (86) modificada por Miller y Ahearn (42) para P.aeruginosa.

Se incubaron 2-3 colonias de la cepa a estudiar en tubos de vidrio que contenían 10 ml. de TSB. En cada ensayo se hizo la siembra por duplicado para realizar la lectura en dos días. Los tubos se incubaron 24 horas y 48 horas (uno por cada tiempo) a 35°C en reposo. Transcurrido este tiempo se aspiró con una pipeta el contenido de los tubos y éstos se llenaron con 10 ml. de agua destilada. El proceso se repitió tres veces eliminando finalmente el agua.

Se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente, se fijaron con calor y se tiñieron con safranina al

0.1% en agua destilada (p/v); tras unos minutos fueron vaciados nuevamente y se procedió a la evaluación. La producción de sustancia mucóide se expresó como positiva o negativa, observando la existencia de una película de "slime" teñida con safranina (prueba positiva) o su ausencia (prueba negativa). Se incluyeron como controles sendas cepas de Staphylococcus epidermidis: HUS-C16/87 (Control positivo) y HUS-C9/87 (Control negativo) procedentes de aislamientos clínicos en las que ya había sido realizado el ensayo.

Los resultados fueron evaluados independientemente por tres observadores.

ADHERENCIA A POLIESTIRENO.

Se estudió la adherencia a poliestireno de las cepas con valores límites de hidrofobicidad, incluyendo una cepa poco hidrófoba (cepa 3) y otra más hidrófoba (cepa 6).

Sustrato sólido.

Se usaron placas de cultivo tisular de 24 pocillos con fondo plano, estériles y con tapadera.

Inóculo.

Se empleó como inóculo bacterias marcadas radiactivamente, haciéndolas crecer en TSB (5 ml) adicionado con 2-H³-adenina (10 µl) e incubando en agitador orbital a 37°C durante 18 horas. Tras este tiempo se centrifugó (3.000 rpm, 15 minutos, 4°C), se decantó el sobrenadante y se lavó el botón bacteriano 3 veces con PBS frío (en iguales condiciones de centrifugación). Con posterioridad las bacterias fueron resuspendidas en PBS y ajustadas espectrofotométricamente a una concentración de 10⁸ UFC/ml.



Suero humano.

A partir de alícuotas de suero se prepararon diluciones en PBS al 10% y al 1%. Se pusieron luego, en tubos de 15 ml, 2 ml de la suspensión antes indicada con 8 ml de PBS, de suero al 10% y de suero al 1%. Los tubos se incubaron a 37°C durante 15 minutos en un baño de agitación para permitir la interacción suero-bacterias.

Metodología de ensayo. (Véase Figura 1).

Una vez preincubadas las bacterias, los tubos se centrifugaron (3.000 rpm, 15 minutos, 4°C), resuspendiendo el botón bacteriano en 10 ml de PBS. Se usaron 3 alícuotas de 100 microlitros de la suspensión bacteriana para la determinación de la radiactividad total inicial (RTI); cada alícuota se puso en un vial de polipropileno al que luego se añadieron 2.5 ml de líquido de centelleo, tras agitación del vial durante un minuto se realizó su lectura en un contador de radiaciones beta. La RTI fué considerada la media de las lecturas de las 3 alícuotas.

Los tiempos estudiados en la interacción bacterias-poliestireno fueron 5, 30 y 60 minutos, 4, 8 y 24 horas. Para cada tiempo se pusieron 2 alícuotas de 0.5 ml de las suspensiones bacterianas en sendos pocillos de la placa de poliestireno. Transcurridos los tiempos correspondientes se añadió a cada pocillo 1.0 ml de PBS frío, para frenar rápidamente el proceso; el contenido del pocillo se puso en un vial de polipropileno; se lavó el pocillo dos veces más con 0.750 ml de PBS frío pasando el líquido de los lavados al mismo vial; este se centrifugó (3.000 rpm 15 minutos, 4°C), se decantó el sobrenadante y se añadieron 2.5 ml de líquido de centelleo, se agitó el vial y se realizó su lectura en

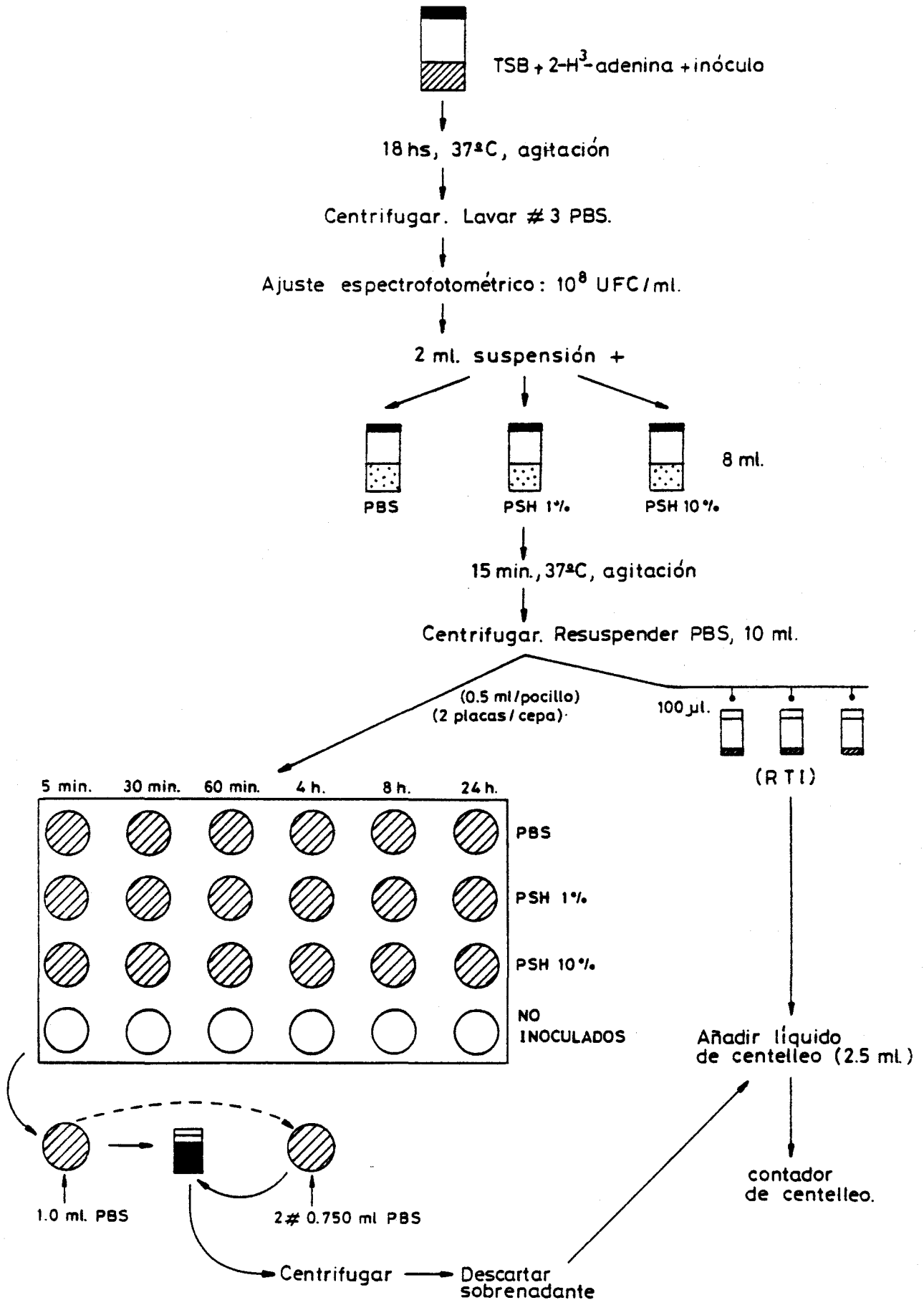


Figura 1. Metodología empleada en el estudio de la adherencia de P.aeruginosa a poliestireno.

el contador de radiaciones beta. El valor obtenido fue considerado el índice de las bacterias no adheridas (R_{sob}); la diferencia entre RTI y R_{sob} (R_{adh}) expresada en relación porcentual de RTI indica la proporción de bacterias adheridas (BA%):

$$R_{adh} = RTI - R_{sob} \quad (1)$$

$$BA\% = \frac{R_{adh}}{RTI} \times 100\% \quad (2)$$

Debe tenerse en cuenta que el valor de RTI, en la práctica, varía ligeramente en cada cepa, aun para una misma concentración expresada en UFC/ml; como es lógico, R_{adh} ⁽¹⁾ variará con cada valor de RTI (R_{adh} será tanto mayor cuanto mayor sea RTI), por esta razón sólo es un valor indirecto de la adherencia bacteriana, no comparable entre cepas diferentes; cuando se expresa la relación entre R_{adh} y RTI el valor obtenido (2) sí que permite esta comparación, por ser un dato que no depende directamente del inóculo inicial.

Con la misma metodología se determinó la adherencia a poliestireno de la cepa 6, creciendo previamente en presencia de 1/4 x CMI de los 6 antimicrobianos estudiados; como control se consideraron los valores obtenidos con la cepa crecida en TSB sin antimicrobianos. En este caso los tiempos estudiados fueron de 5 minutos y 8 horas.

ADHERENCIA A CATETERES.

Empleamos un método cuantitativo modificado de la técnica previamente descrita por Ashkenazi y Mirelman (66):

Se incubaron segmentos de 1.0 cm de longitud de cada uno de los cuatro catéteres a estudiar en 10 ml. de PBS a 37°C durante una hora, como han aconsejado otros autores (67).

Tras este tiempo se pusieron 2 segmentos de catéter por cada tiempo a estudiar en un frasco estéril de vidrio con tapón de rosca. Para cada biomaterial y cada cepa se empleó un frasco diferente. Como inóculo se empleó una suspensión en PBS de bacterias marcadas radiactivamente, conteniendo 10^8 UFC/ml, obtenida como se explica previamente en el apartado "Adherencia a poliestireno". Cada frasco conteniendo segmentos de catéter fue inoculado con 10.0 ml. de este inóculo. Además de las nueve cepas habituales, se estudió también la adherencia de la variante no mucóide de la cepa 9 a PVC-1 y a PUT, empleando para ello la misma metodología.

Los tiempos a estudiar fueron 5, 15, 30, y 60 minutos, 4, y 8 horas y 1,2,3,4,5,6 y 7 días. El momento de la introducción de los catéteres en el frasco correspondiente se consideró tiempo cero. Los frascos se incubaron a 37°C en reposo. Pasado el tiempo predeterminado se sacaron las dos piezas de catéter correspondientes y se lavaron en PBS frío 5 veces. Se comprobó que el PBS del último lavado no contenía radiactividad, para asegurar que los lavados lograron la eliminación de las bacterias no adheridas al catéter. Cada fragmento de catéter se colocó entonces en un vial de polipropileno al que se añadieron 2.5 ml de líquido de centelleo. Se agitó el vial durante un minuto y se realizó ya la correspondiente lectura.

La determinación del número de bacterias correspondientes a cada cuenta por minuto (CPM) (eficacia de marcaje, EM) se hizo poniendo 100 microlitros de la

suspensión bacteriana (10^7 UFC) en un vial de polipropileno; se añadieron 2.5 ml. de líquido de centelleo, se agitó el vial, y se leyó en el contador de radiación beta. Para minimizar el error se hicieron 3 lecturas de sendas alícuotas considerando el valor final a la media de estas lecturas. El resultado de dividir 10^7 UFC por el número de CPM corresponde al valor de EM.

El número de CPM obtenido en la lectura de cada vial con un segmento de catéter, corregido con el factor de CPM basales en una muestra no radiactiva, fue multiplicado por la correspondiente EM lo que nos permitió determinar el número de bacterias adheridas al catéter. Para facilitar la comparación entre los diferentes biomateriales el número de bacterias adheridas se dividió por la superficie total expuesta (en cm^2) de cada segmento de catéter, obteniéndose, finalmente, el número de bacterias adheridas por cm^2 de biomaterial.

Siguiendo el mismo método hemos comparado la adherencia a los cuatro biomateriales de la cepa 2, tras haber crecido en presencia de $1/4$ x CMI de amicacina, ceftazidima y ciprofloxacina o en un caldo libre de antimicrobiano. Los tiempos de estudio fijados fueron 1 y 4 horas y 1 y 3 días. Se escogió esta cepa por ser la que globalmente presentó cifras de adherencia mayores; los antimicrobianos y los tiempos fueron elegidos en función de los resultados obtenidos con el modelo de adherencia a poliestireno; hemos incluido un representante de cada una de las tres familias estudiadas: aminoglucósidos, betalactámicos y quinolonas.

ESTUDIO DE LA ADHERENCIA DE P.AERUGINOSA A BIOMATERIALES CON MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO.

Hemos estudiado con microscopía electrónica de barrido (MEB) la adherencia de la cepa 2.

Se siguió la misma metodología expuesta en "Adherencia a catéteres" hasta el momento en que, una vez que se sacaron los segmentos de catéteres, estos se pusieron en un frasco con fijador de Palay durante 3-4 horas, para su fijación. A continuación se realizó un lavado con PBS (5 minutos) y posteriormente un baño con tetróxido de osmio al 0.1% durante 20 minutos.

Las preparaciones se deshidrataron mediante pases sucesivos en etanol de 70°, 90°, 96° (5 minutos cada uno) y 100° (3 horas). Una vez deshidratadas se desecaron con la técnica del punto crítico de CO₂.

Las muestras se fijaron a un estativo de aluminio y se metalizaron con una película de oro de 300Å.

En estas condiciones, finalmente, se efectuó la observación en el MEB.

EFFECTO DEL BIOMATERIAL EN LA SUPERVIVENCIA DE P.AERUGINOSA (Figuras 2 y 3).

Hemos evaluado en varios experimentos el efecto que tiene la presencia de los biomateriales estudiados en la supervivencia de P.aeruginosa.

En primer lugar se comparó el número de bacterias que sobreviven en PBS en frascos con y sin segmentos de catéter; para ello estudiamos en sucesivos tiempos (cero horas, 8 horas, 1 día, 2 días, 5 días, 7 días y 10 días) el número de UFC/ml viables en dos

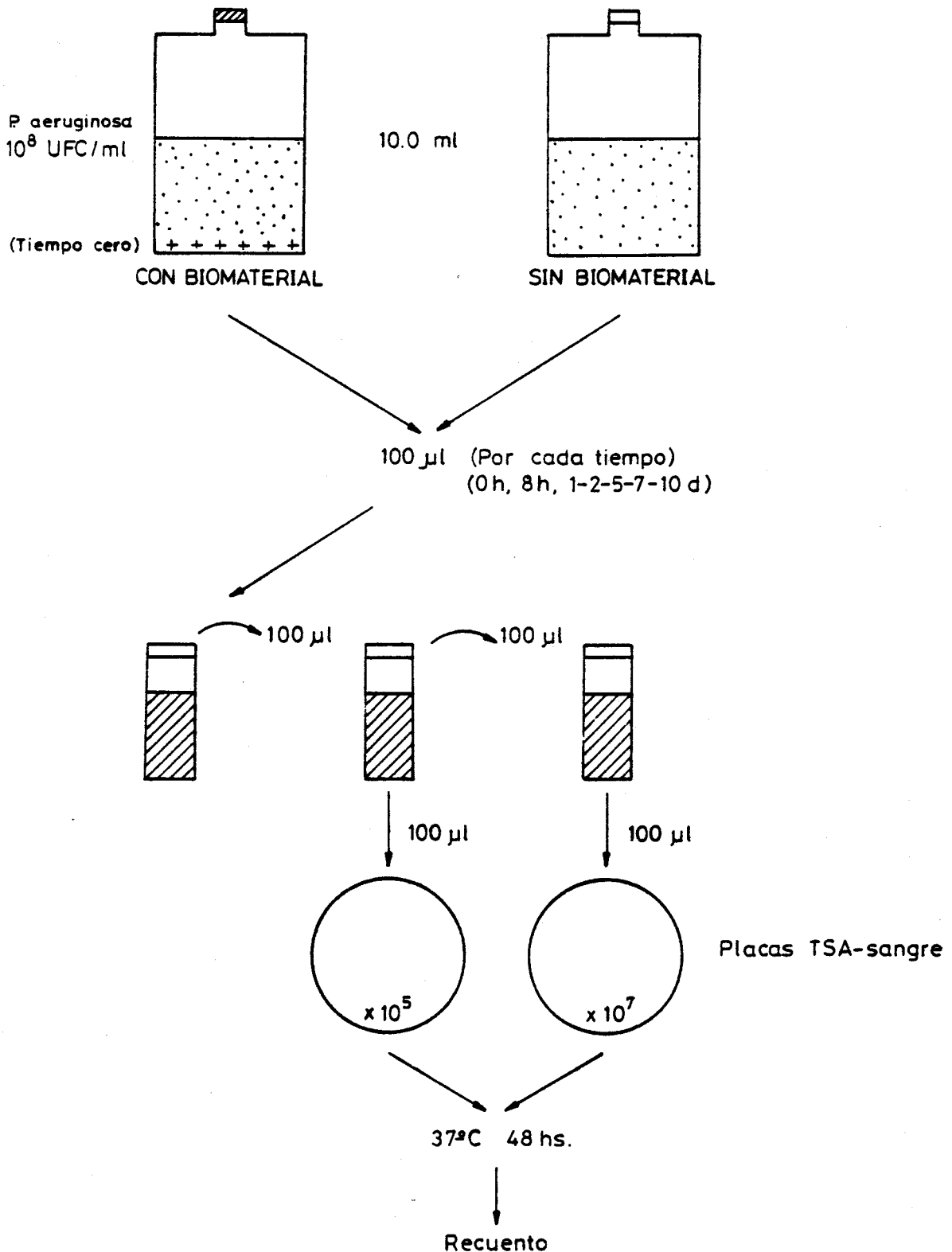


Figura 2. Metodología empleada para el estudio del efecto de la existencia de biomateriales en la supervivencia de P.aeruginosa en suspensión: cloruro de polivinilo (PVC-1 y PVC-2) látex siliconizado (LS) y poliuretano (PUT).

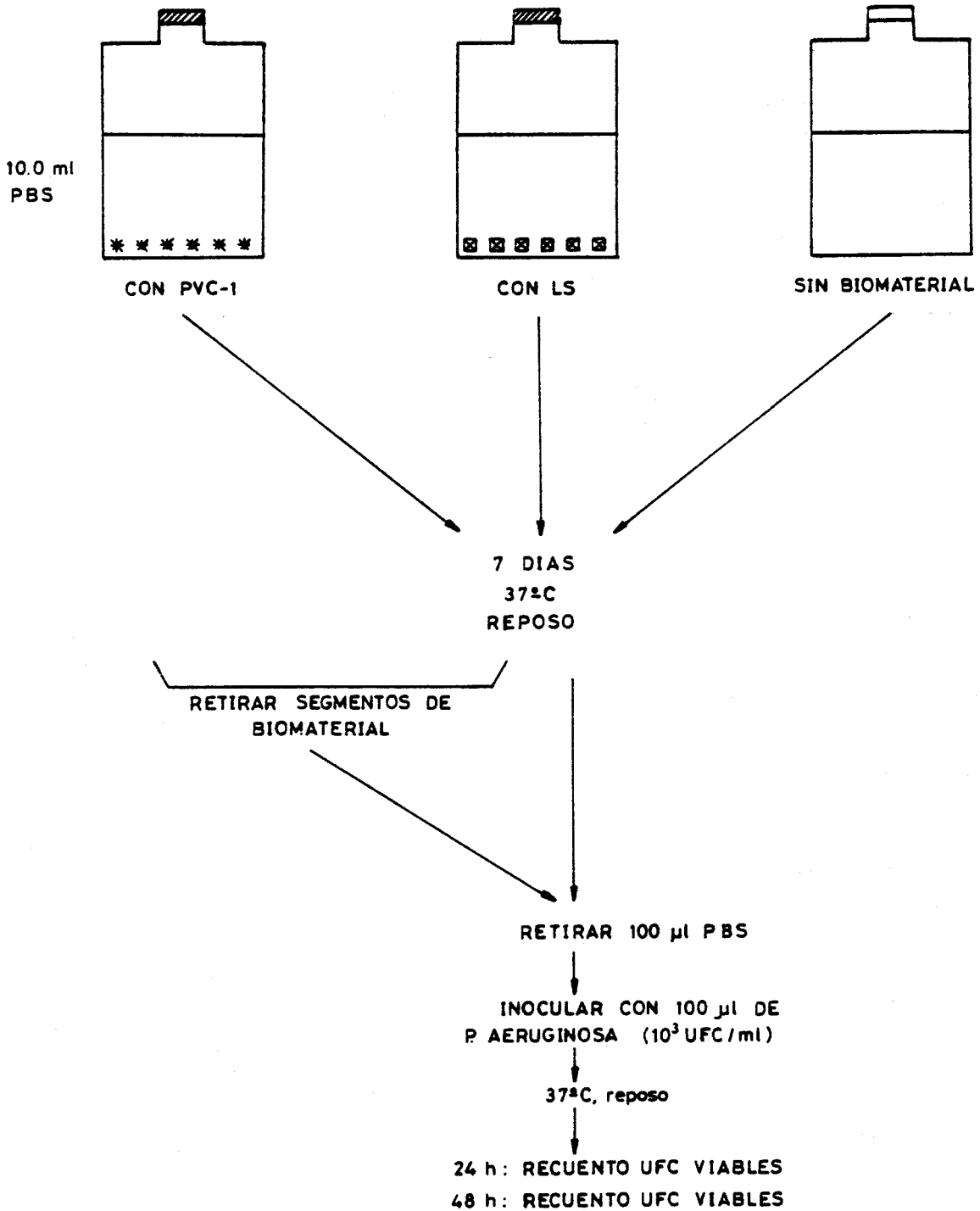


Figura 3. Metodología empleada para el estudio de la supervivencia de *P.aeruginosa* en el sobrenadante de PBS libre (control) o en el que se habían incubado fragmentos de biomaterial. (PVC-1 o LS).

suspensiones de 10.0 ml de P.aeruginosa. Una de las suspensiones contenía 30 segmentos de catéter de 1.0 cm de longitud, la otra sólo P.aeruginosa. En el momento inicial (tiempo cero) en ambas había 10^8 UFC/ml. (Figura 2).

La metodología empleada en la preparación de estas suspensiones fue similar a la descrita en el apartado "Adherencia a catéteres". Los frascos se incubaron a 37°C , en reposo.

En los tiempos indicados se tomaron 100 microlitros de ambas suspensiones, haciéndose recuento por la técnica de diluciones progresivas y siembra en placa de TSA. Una vez sembradas, las placas se incubaron a 37°C , 48 horas, y se contaron las colonias que aparecían. Cuando se trató de cepas mucoides se especificó la cantidad de colonias mucoides y no mucoides observadas.

Posteriormente se comprobó si el efecto observado con algunos biomateriales era independiente de la existencia de P.aeruginosa (Figura 3). Para ello se añadieron 30 segmentos de catéteres (PVC-1 o LS) a sendos frascos con 10.0 ml de PBS estéril, dejando otro frasco con sólo PBS estéril, como control sin catéter. Tras incubar 7 días, 37°C , en reposo, se retiraron los catéteres de los frascos correspondientes; se retiraron también de todos los frascos 100 μl de PBS y se inocularon con 100 μl de una suspensión de P.aeruginosa conteniendo 10^3 UFC/ml, se incubaron los frascos, 37°C sin agitación (tiempo cero) y se hizo el recuento de UFC/ml viables en los días 1 y 2.

ESTUDIO ESTADISTICO.

Los resultados se han expresado como la media de los valores obtenidos en los experimentos homólogos, más menos su desviación estándar ($\bar{X} \pm SD$).

La significación estadística de los resultados se ha evaluado empleando la prueba "t" de Student para pequeñas muestras.

RESULTADOS

IDENTIFICACION Y SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS.

El origen, los biotipos y la sensibilidad de las nueve cepas estudiadas se recogen en la Tabla 3. De las nueve cepas, seis son no mucoides y las tres restantes mucoides, estas últimas fueron aisladas del esputo de pacientes con fibrosis quística. Las nueve cepas pertenecían a cuatro biotipos diferentes; el origen de las cepas no se asoció con alguno de ellos en particular.

Los resultados sobre la sensibilidad de nuestras cepas a los antimicrobianos usados indican que éstos poseen, como podría esperarse, una marcada acción bactericida, con valores de CMI y CMB iguales o muy próximos. No hemos observado diferencias de sensibilidad entre las cepas mucoides y las no mucoides.

TABLA 3. Cepas estudiadas. Origen, biotipo y sensibilidad.

Cepa	Origen	Biotipo	CMI (CMB) ^a					
			AK	CZ	IM	CF	NF	OF
1	Exudado de herida	1154575	4	0.25	2	0.06	0.25	0.25
2	Sangre	1159575	1	0.25	2	0.5	2 (4)	4
3	Exudado faríngeo	1154575	8	4	4	0.03	0.5	0.5 (1)
4	Aspirado bronquial	1155575	1	0.25	2 (4)	0.06	0.5	0.5 (1)
5	Exudado de herida	1155575	4 (8)	4	4	0.06 (0.125)	0.25	1
6	Orina	1154575	2 (4)	0.5	2 (4)	0.03	0.125	0.25
7b	Espuito	1154575	4	0.5	4 (8)	0.03	0.25	0.25
8b	Espuito	1144575	2 (4)	0.25	2 (4)	0.06 (0.125)	0.5	0.5
9b	Espuito	1155575	8	1	4 (8)	1	4	8

a:

Valores expresados en mg/l.

CMI = CMB, salvo en los datos señalados entre paréntesis, correspondientes a CMB.

b:

Cepa mucoide (Procedente de pacientes con fibrosis quística).

HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE.

La HS ha variado según la cepa considerada (Tabla 4). Los valores han oscilado entre $15.0 \pm 0.6\%$ (cepa 3) y $44.6 \pm 6.4\%$ (cepa 6), ambas no mucoides. En conjunto, de las cepas no mucoides, 2 fueron relativamente hidrófobas (cepas 2 y 6) y el resto relativamente hidrófilas. Las tres cepas mucoides presentaron valores intermedios ($20.5 \pm 1.8\%$ a $23.0 \pm 12.0\%$). Los valores de HS no se han relacionado con determinados biotipos.

No hemos observado variación significativa ($p > 0.05$) en los valores de HS de bacterias crecidas en agitación, ni tampoco cuando se empleó $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ en la realización del ensayo (Tabla 4).

La preincubación bacteriana en presencia de concentraciones subinhibitorias ($1/4 \times \text{CMI}$) de los antimicrobianos en estudio no modificó ($p > 0.05$) la expresión de la HS (Tabla 5).

El estudio de la HS de las bacterias preincubadas en suero nos ha permitido observar una reducción significativa ($p < 0.01$) de la misma en la cepa 6: $44.6 \pm 6.4\%$ (control) frente a $25.8 \pm 1.3\%$ (suero 1%) y $1.0 \pm 2.8\%$ (suero 10%). Con la cepa 3, en cambio, no hubo tales diferencias ($p > 0.05$); en este caso los valores de HS fueron de $17.9 \pm 2.4\%$ (control), $20.0 \pm 2.8\%$ (suero 1%) y $14.8 \pm 4.5\%$ (suero 10%).

DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE SUSTANCIA MUCOIDE ("SLIME").

Ninguna de las nueve cepas de P.aeruginosa dio

TABLA 4. Hidrofobicidad de superficie. Cepas crecidas estacionariamente o en agitación. Hidrofobicidad de superficie de cepas crecidas estacionariamente y determinada tras la adición de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$. (Media \pm SD).

Cepa	Crecimiento Estacionario	Crecimiento En agitación	Ensayo con $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$
1	17.9 \pm 2.4	23.4 \pm 6.5	15.9 \pm 1.7
2	42.1 \pm 0.4	46.5 \pm 0.6	40.7 \pm 17.4
3	15.0 \pm 0.6	17.3 \pm 4.3	17.1 \pm 0.9
4	15.0 \pm 3.5	16.2 \pm 2.5	11.3 \pm 0.9
5	18.8 \pm 2.0	23.0 \pm 9.5	17.3 \pm 3.5
6	44.6 \pm 6.4	42.8 \pm 1.3	44.8 \pm 7.4
7	23.0 \pm 12.0	24.0 \pm 13.7	32.6 \pm 6.2.
8	20.5 \pm 1.8	19.6 \pm 6.3	27.9 \pm 1.3
9	22.4 \pm 5.1	22.2 \pm 1.8	18.6 \pm 0.7

Diferencias no significativas ($p > 0.05$).

TABLA 5. Hidrofobicidad de superficie. Cepas crecidas en presencia de 1/4 x CMI de los distintos antimicrobianos. Control: bacterias crecidas en medio sin antimicrobiano. (Media \pm SD).

Cepa	Control	Amicacina	Ceftazidima	Imipenema	Ciprofloxacina	Ofloxacina	Norfloxacina
1	17.9 \pm 2.4	29.0 \pm 12.2	20.9 \pm 13.2	18.9 \pm 4.8	12.4 \pm 1.5	20.1 \pm 6.5	18.0 \pm 5.6
2	42.1 \pm 0.4	45.5 \pm 11.3	42.0 \pm 10.3	44.8 \pm 0.1	36.2 \pm 7.4	40.0 \pm 3.5	43.2 \pm 5.0
3	15.0 \pm 0.6	23.0 \pm 3.5	26.1 \pm 2.8	23.0 \pm 1.1	16.6 \pm 2.4	17.1 \pm 3.1	23.8 \pm 4.8
4	15.0 \pm 3.5	23.6 \pm 1.0	19.2 \pm 3.2	23.6 \pm 8.3	21.2 \pm 2.3	22.3 \pm 8.6	23.4 \pm 2.4
5	18.8 \pm 2.0	17.2 \pm 3.4	21.4 \pm 6.1	16.8 \pm 1.4	21.2 \pm 5.4	17.4 \pm 1.7	20.4 \pm 1.4
6	44.6 \pm 6.4	48.6 \pm 5.9	42.4 \pm 2.7	46.6 \pm 8.5	38.6 \pm 2.5	47.2 \pm 1.0	39.0 \pm 12.2
7	23.0 \pm 12.0	33.0 \pm 14.6	13.6 \pm 9.2	14.4 \pm 1.7	18.4 \pm 6.6	27.3 \pm 1.2	24.4 \pm 1.8
8	20.5 \pm 1.8	28.6 \pm 1.8	31.7 \pm 9.6	20.6 \pm 2.5	21.7 \pm 3.0	22.9 \pm 3.8	20.6 \pm 5.3
9	22.4 \pm 5.1	24.1 \pm 16.4	15.9 \pm 5.8	27.0 \pm 7.8	21.4 \pm 4.5	24.1 \pm 4.3	24.7 \pm 5.8

Diferencias no significativas ($p > 0.05$).

positiva la prueba empleada en la detección de "slime". Estos resultados se observaron tanto a las 24 como a las 48 horas y fueron idénticos al ser evaluados por los tres observadores que interpretaron esta prueba. Los controles positivo y negativo de S.epidermidis empleados en el ensayo dieron los resultados esperados.

ADHERENCIA A POLIESTIRENO.

Los resultados de la cinética de adherencia a poliestireno de las cepas 3 y 6 aparecen en la Figura 4. La adherencia fue significativamente mayor para la cepa 6 que para la cepa 3 a los 5, 30 y 60 minutos y a las 4 horas ($p < 0.01$). Tras ese tiempo, tanto a las 8 como a las 24 horas, los resultados fueron similares ($p > 0.05$) en ambos casos.

La influencia de la preincubación en suero (1% o 10%) de estas mismas cepas en la adherencia a poliestireno se ofrece en las Figuras 5A y 5B. La preincubación en suero de la cepa 6 redujo significativamente ($p < 0.01$) su adherencia tanto a los 5 minutos (control: $58.8 \pm 6.2\%$ frente a 19.0 ± 4.9 con suero 1% y $11.7 \pm 6.0\%$ con suero 10%) como a las 24 horas (control: $81.7 \pm 2.0\%$ frente a $60.0 \pm 0.6\%$ con suero 1% y $57.6 \pm 0.1\%$ con suero 10%) (Figura 5B).

En la cepa 3, en cambio, no se apreciaron estas diferencias, los resultados obtenidos fueron a los 5 minutos de $37.4 \pm 2.8\%$ en el control frente a $29.4 \pm 9.4\%$ con suero 1% y $28.6 \pm 2.3\%$ con suero 10%, y a las 24 horas de $78.8 \pm 6.2\%$ (control) frente a $78.2 \pm 5.0\%$ (suero 1%) y $83.8 \pm 7.1\%$ (suero 10%) (Figura 5A).

El crecimiento de la cepa 6 en presencia de $1/4 \times$

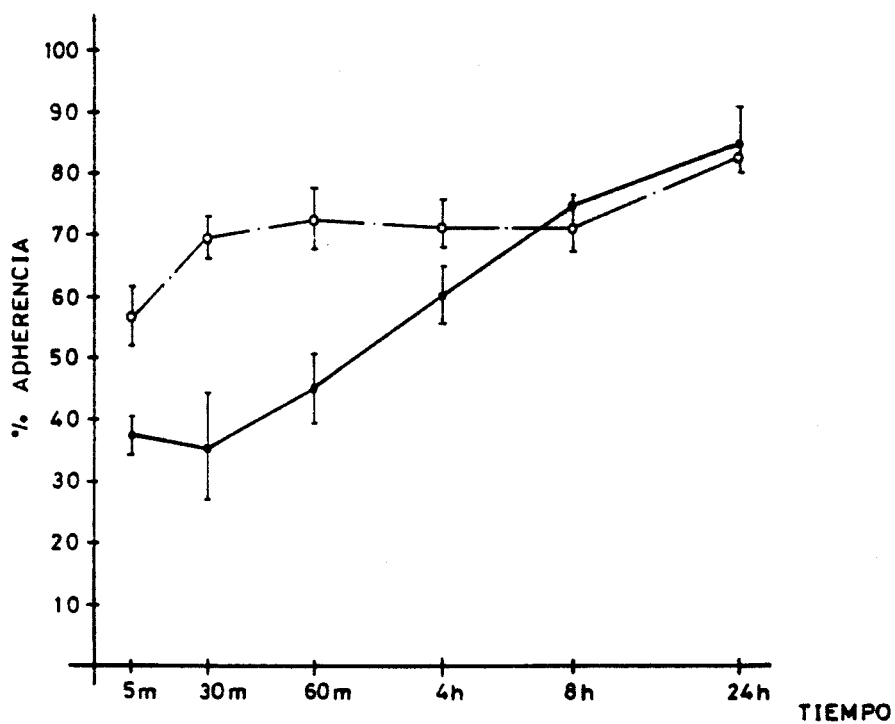


Figura 4. Adherencia a poliestireno de 2 cepas de P.aeruginosa. Ceba 3 (hidrófila) (●—●) y ceba 6 (hidrófoba) (○-○).

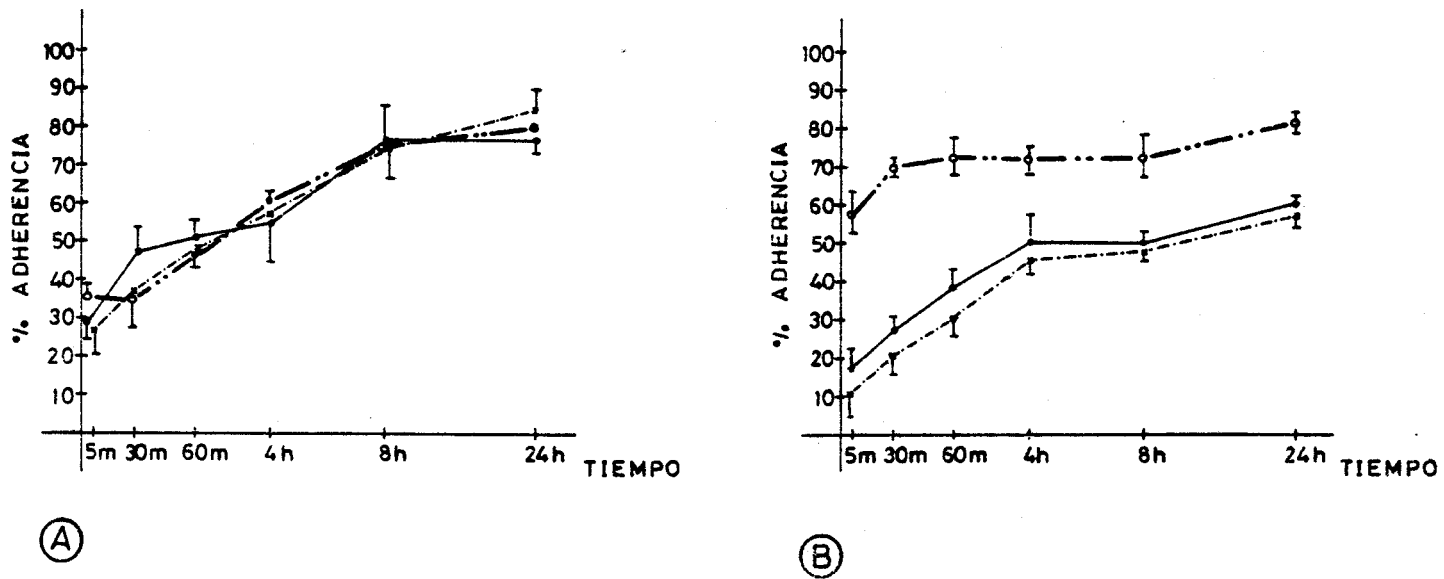


Figura 5. Adherencia de 2 cepas de *P.aeruginosa* a poliestireno. 5A: Cepa 3. (hidrófila). 5B: Cepa 6 (hidrófoba). Efecto de la preincubación bacteriana en suero humano al 1% (●—●), y al 10% (x---x). Control (o----o).

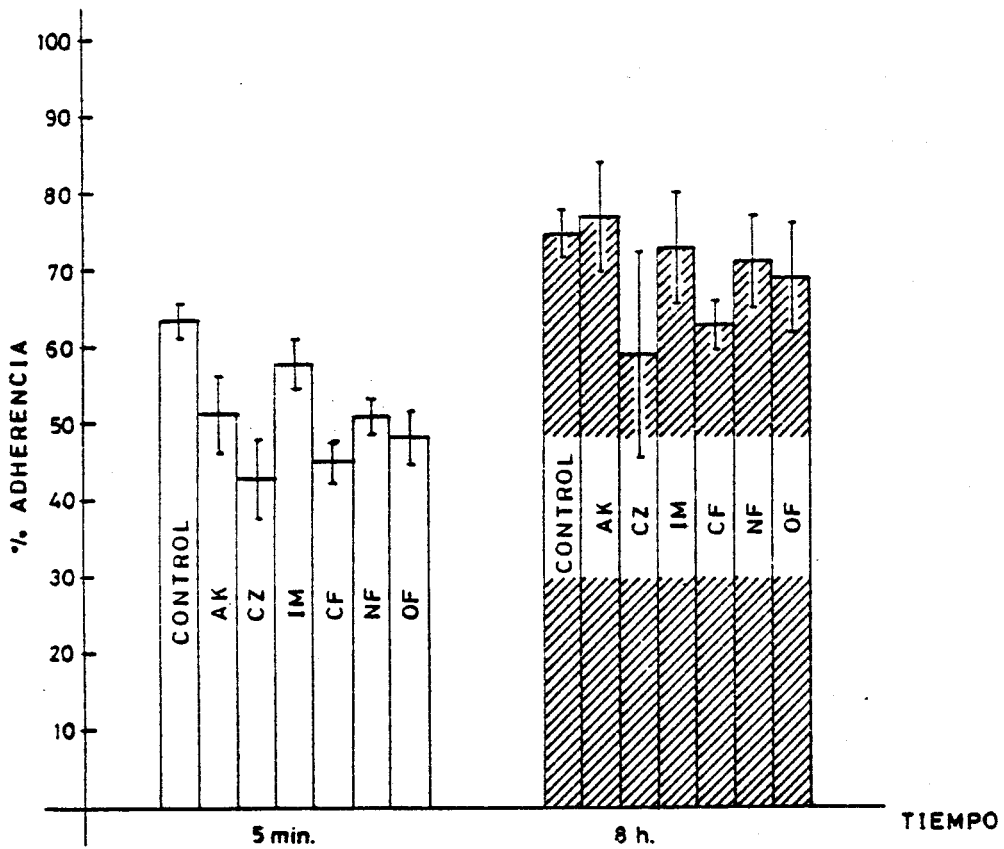


Figura 6. Adherencia de P.aeruginosa a poliestireno (cepa 6). Efecto de la incubación bacteriana en presencia de 1/4 x CMI de amicacina (AK); ceftazidima, imipenema (IM), ciprofloxacina (CF), norfloxacina (NF) y ofloxacina (OF).

CMI de los distintos antimicrobianos redujo su adherencia a poliestireno a los 5 minutos (control: $63.7 \pm 2.6\%$) cuando se trataba de amicacina ($51.6 \pm 5.2\%$), ceftazidima ($42.9 \pm 5.2\%$), ciprofloxacina ($45.1 \pm 2.8\%$) norfloxacina ($51.2 \pm 2.6\%$) y ofloxacina ($48.2 \pm 3.7\%$), pero no cuando se trataba de imipenema ($57.6 \pm 3.3\%$). Esta disminución persistía a las 8 horas (control: $75.2 \pm 3.0\%$) en las cepas preincubadas con ceftazidima ($59.1 \pm 13.8\%$) y ciprofloxacina ($63.9 \pm 3.1\%$) (Figura 6).

ADHERENCIA A CATETERES.

Adherencia a cloruro de polivinilo.

Los resultados del estudio de la adherencia de nuestras cepas a PVC-1 se ofrecen en la Tabla 6 y en las Figuras 7A-D, 8 y 9A.

Hemos distinguido dos grupos de cepas, el primero de cepas no mucoides (I) (cepas 1 a 6) y el segundo de cepas mucoides (II) (cepas 7 a 9).

En los momentos iniciales de la interacción, el comportamiento en el grupo I difirió significativamente ($p < 0.01$) del observado en el grupo II. En cepas no mucoides los valores de adherencia han variado entre 0.31 y 0.67×10^6 UFC/cm², mientras que para el grupo de cepas mucoides lo han hecho entre 0.01 y 0.062×10^6 UFC/cm² (cifras 10-30 veces menores).

En el grupo II (cepas mucoides) las cifras de adherencia aumentaron a lo largo del tiempo hasta alcanzar su valor máximo (Adh_{max}) a los 2 días (cepa 7:

Tabla 6. Adherencia de *P.aeruginosa* (10^8 UFC/ml) a catéteres de polivinilo (PVC-1). Datos expresados en UFC x $10^6/cm^2$ de biomaterial.

CEPA TIEMPO	1	3	4	5	2	6	7	8	9	9R*
5 min.	0.48	0.45	0.31	0.37	0.63	0.67	0.020	0.062	0.010	0.17
15 min.	0.60	0.61	0.46	0.37	0.81	0.89	0.045	0.091	0.026	0.23
30 min.	0.78	0.81	0.72	0.70	1.3	1.2	0.10	0.12	0.032	0.32
60 min.	1.9	2.0	1.1	1.0	2.5	3.6	0.15	0.13	0.039	1.0
4 horas	2.1	6.3	2.2	1.7	3.1	3.3	0.17	0.17	0.044	1.1
8 horas	2.7	7.2	2.1	4.0	4.0	3.2	0.20	0.49	0.049	1.3
1 día	2.5	17.0	2.2	4.9	5.7	2.3	0.22	0.50	0.21	1.6
2 días	3.1	19.0	2.4	5.9	12.0	1.9	0.36	0.62	0.29	2.0
3 días	4.8	18.0	2.4	6.0	15.0	1.4	0.30	0.97	0.31	1.5
4 días	6.7	17.0	2.0	5.9	13.0	0.9	0.28	1.0	0.68	1.2
5 días	6.6	15.0	1.7	5.5	10.0	0.9	0.30	1.5	0.86	1.3
6 días	6.6	8.3	1.5	5.5	9.2	1.0	0.26	1.8	0.93	1.4
7 días	6.6	8.3	1.5	4.2	8.7	0.9	0.23	1.7	1.2	1.4

* Variante no mucoide de la cepa 9.

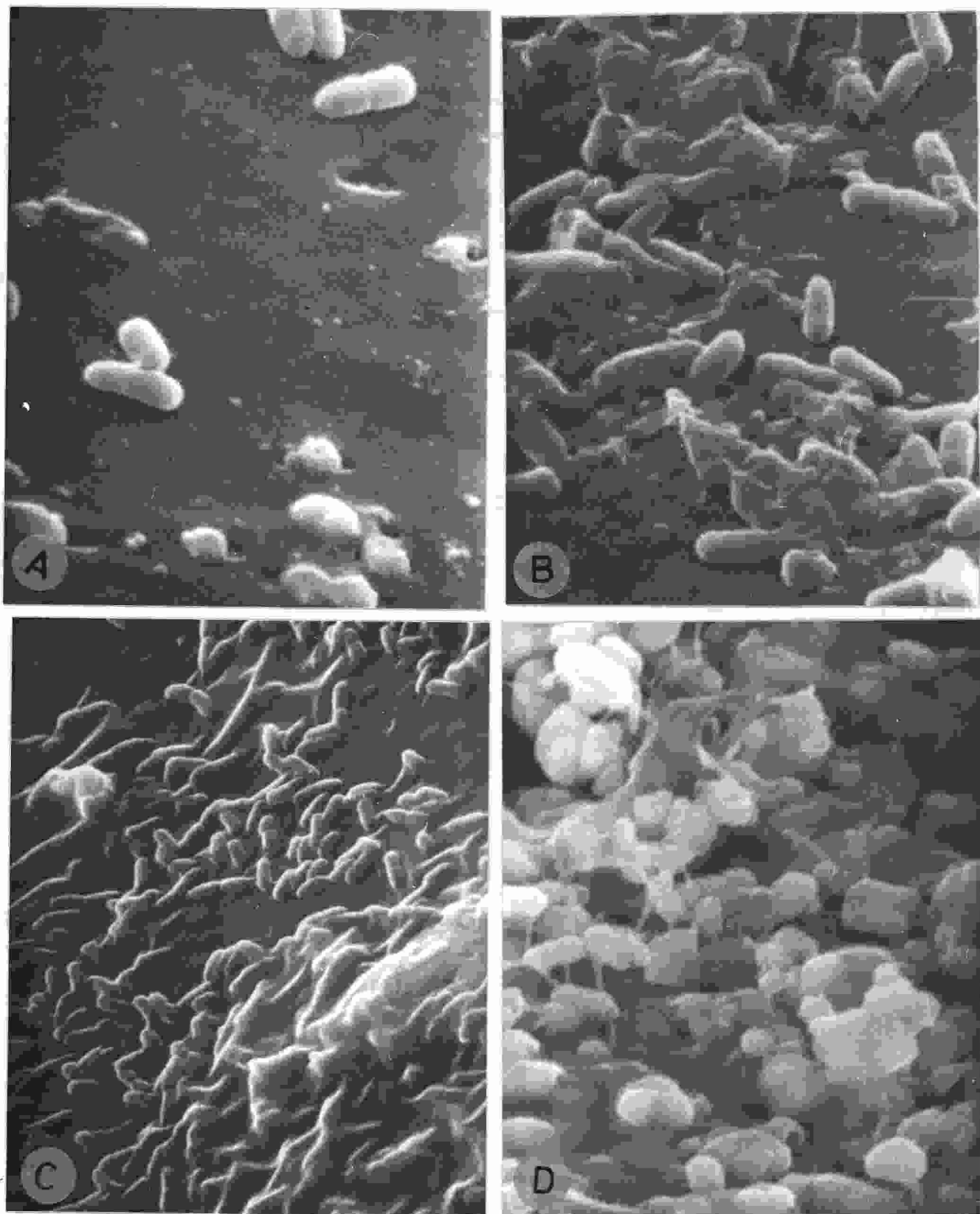


Figura 7. Adherencia de *P.aeruginosa* (cepa 2) a cloruro de polivinilo (PVC-1). A: 5 minutos. B: 1 hora. C: 4 horas. D: 24 horas. A.B.D: x 10.000. C: x 4.000.

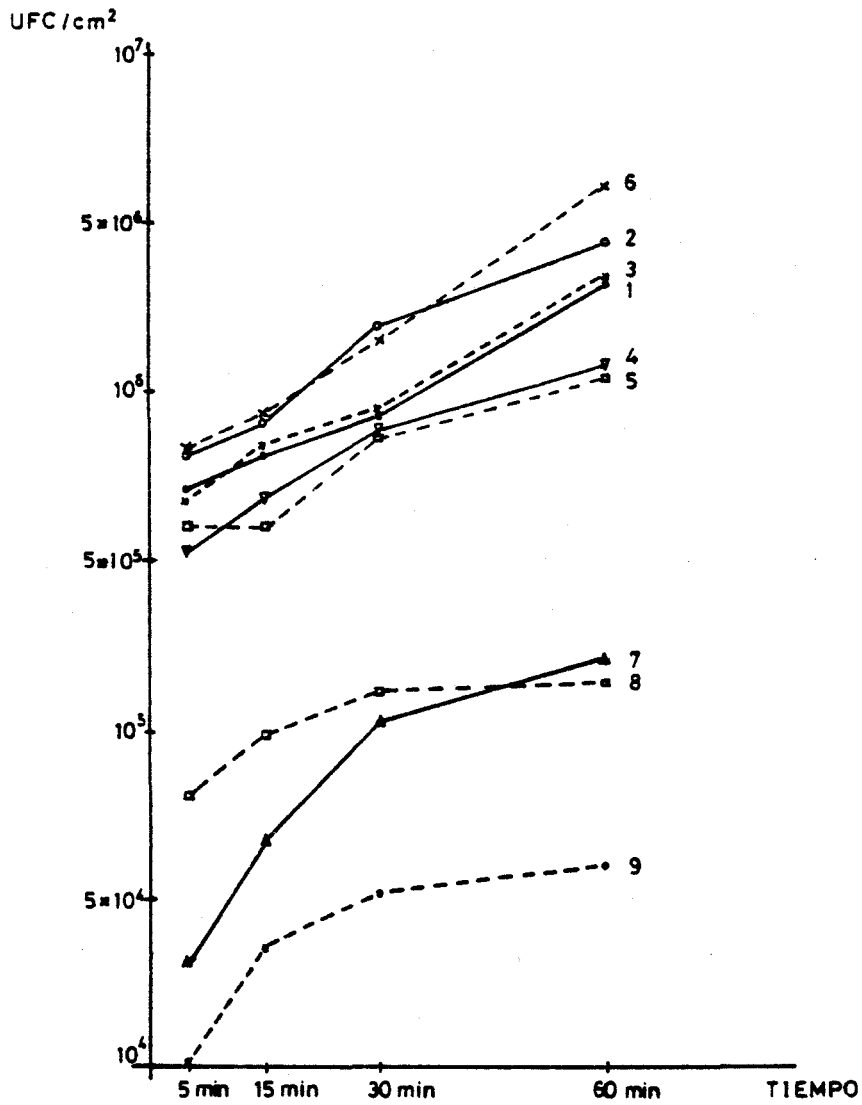


Figura 8. Adherencia de seis cepas no mucoides (1-6) y tres mucoides (7-9) de P.aeruginosa a catéteres de cloruro de polivinilo (PVC-1). Fase inicial. (≤ 60 minutos).

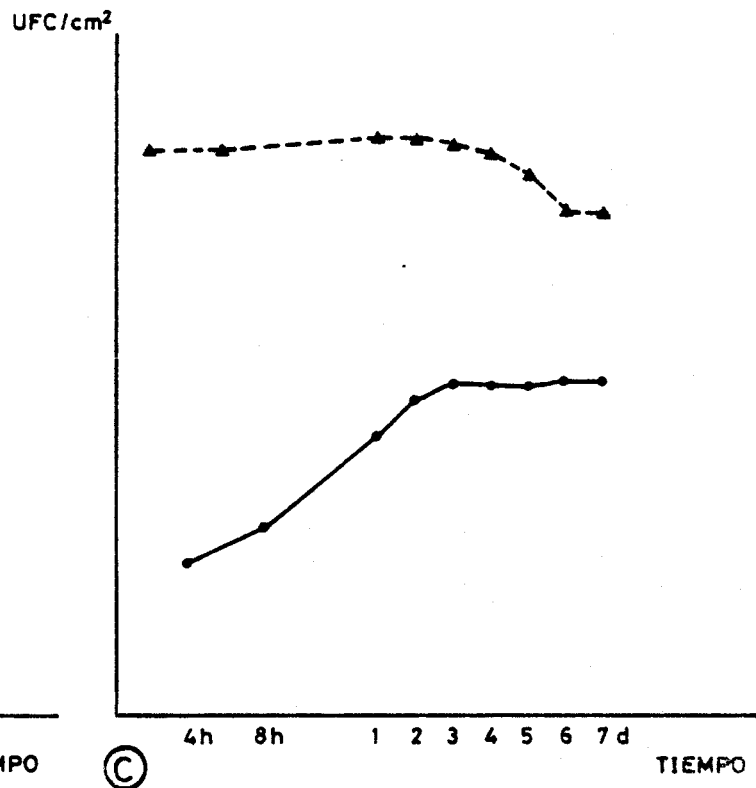
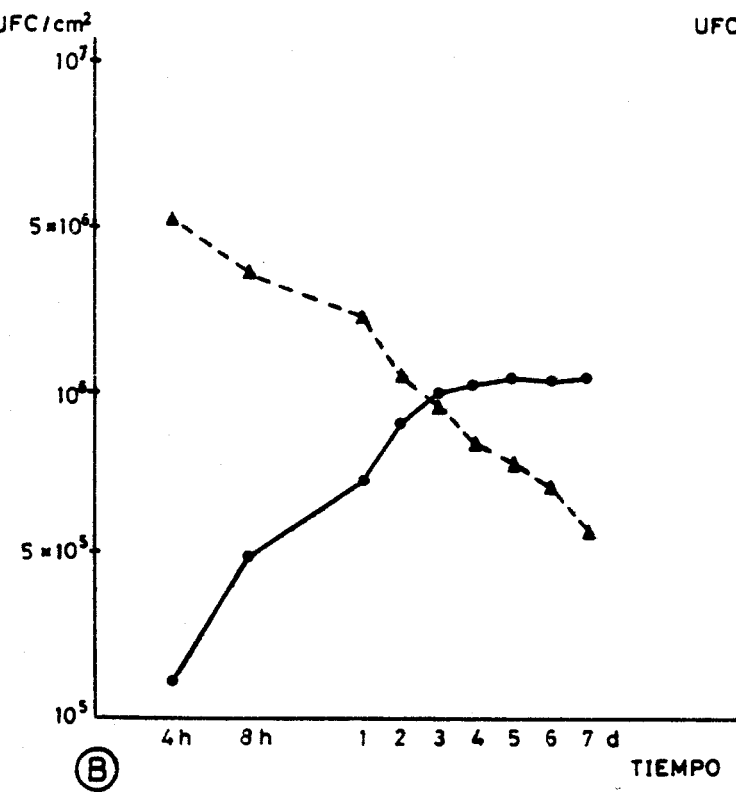
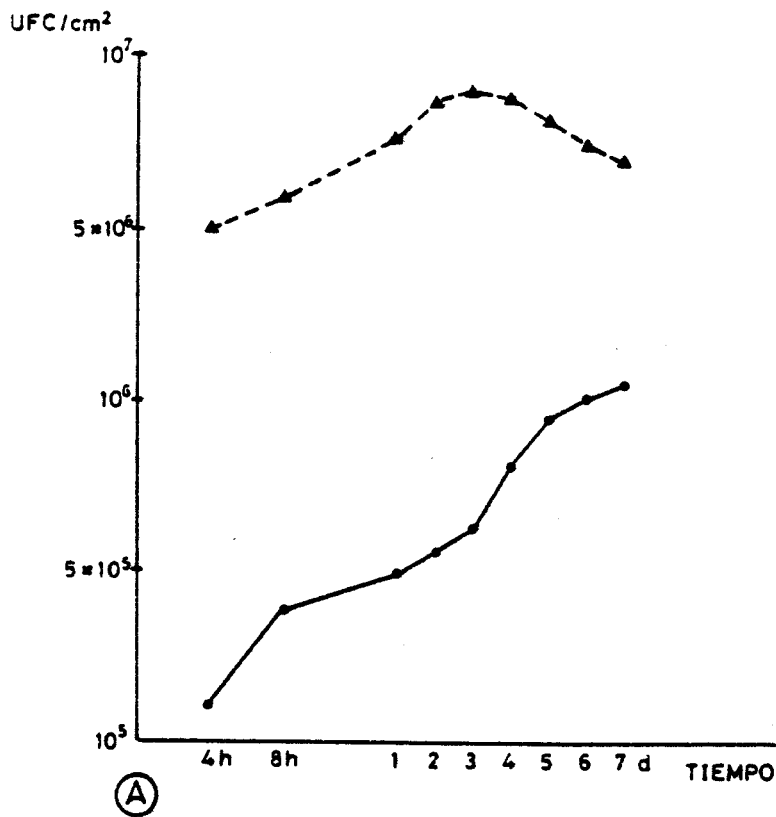


Figura 9. Valores medios de la adherencia de tres cepas mucoides (●—●) y seis no mucoides (▲—▲) de *P. aeruginosa* a tres biomateriales: cloruro de polivinilo (9A) poliuretano (9B) y látex siliconizado (9C).

0.36×10^6 UFC/cm²), 6 días (cepa 8: 1.8×10^6 UFC/cm²) y 7 días (cepa 9: 1.2×10^6 UFC/cm²).

Al considerar las cepas no mucoides también hemos podido observar diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las cepas hidrófilas y las cepas hidrófobas, tanto a los 5 como a los 60 minutos (Figura 8). A los 5 minutos, en el grupo de cepas hidrófilas el rango de adherencia fue de $0.4 \pm 0.08 \times 10^6$ UFC/cm², mientras que en el de cepas hidrófobas fue de $0.65 \pm 0.03 \times 10^6$ UFC/cm²; tras 60 minutos estos valores fueron de $1.25 \pm 0.4 \times 10^6$ UFC/cm² (cepas hidrófilas) y $3.0 \pm 0.8 \times 10^6$ UFC/cm² (cepas hidrófobas).

A las 4 horas de interacción el comportamiento varió dependiendo de la cepa considerada, con independencia del valor de la HS de la misma. En todas las cepas las cifras de adherencia aumentaron con el tiempo (Figuras 7A-7D), alcanzando una Adh_{max} entre 2.4×10^6 UFC/cm² (cepa 4) y 19×10^6 UFC/cm² (cepa 3). Con excepción de la cepa 6 en la que Adh_{max} se alcanzó en tan sólo 60 minutos, este valor se obtuvo en el resto de las cepas no mucoides alrededor del día 3 (Figura 9A).

Tras alcanzarse el máximo de adherencia, el número de bacterias adheridas decreció lentamente hasta el último día estudiado, día 7, donde los valores variaron entre 0.9×10^6 UFC/cm² (cepa 6) y 8.7×10^6 UFC/cm² (cepa 2).

Hemos estudiado también la adherencia de dos cepas no mucoides (2 y 6) y de otras dos mucoides (8 y 9) a catéteres peritoneales de PVC (PVC-2). Los resultados que comparan la adherencia de estas 4 cepas a PVC-1 y a PVC-2, en distintos tiempos aparecen en las Figuras 10 y 11.

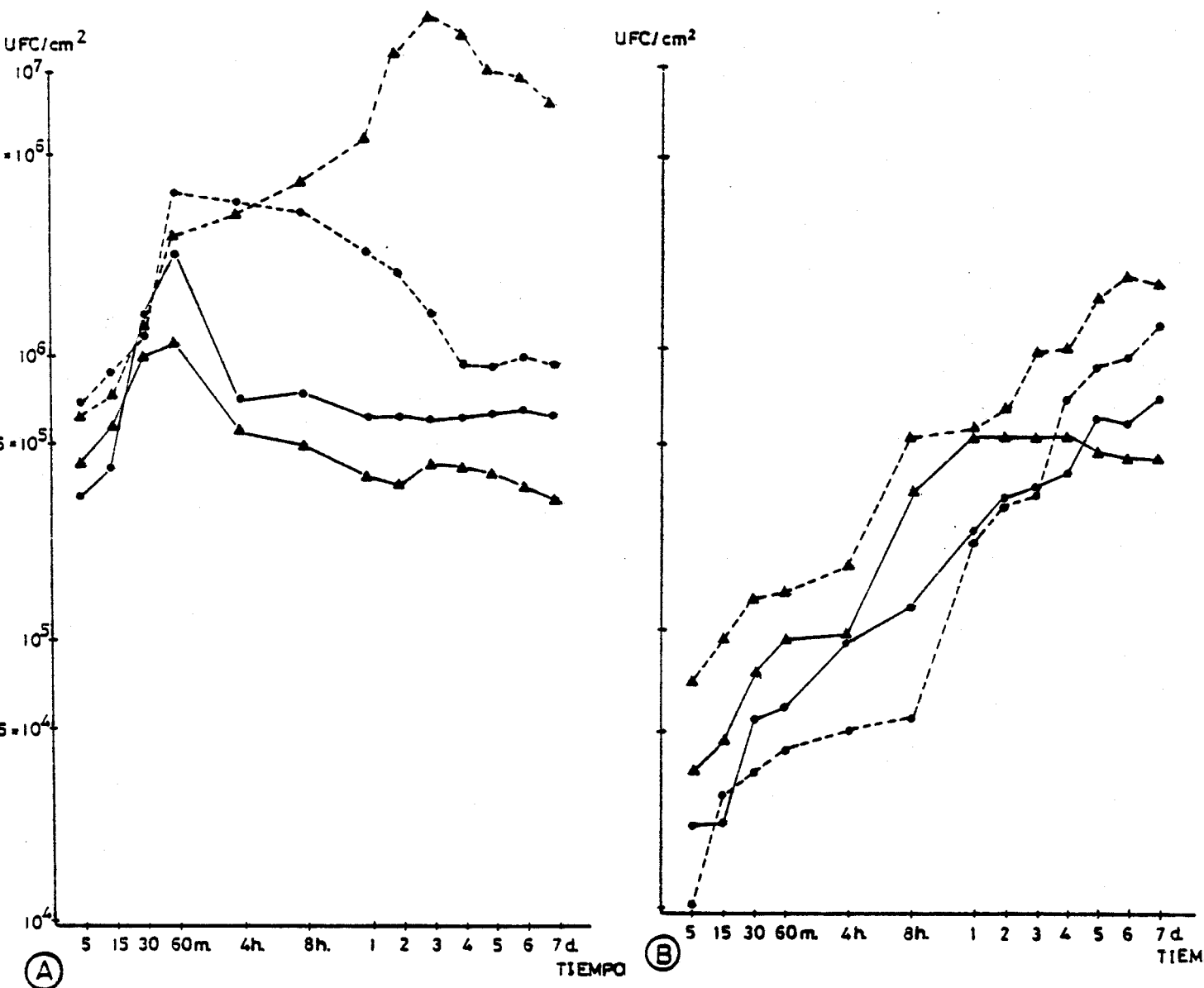


Figura 10. Adherencia de *P.aeruginosa* a dos biomateriales con igual polímero base, cloruro de polivinilo PVC-1 (-----) y PVC-2 (—).

A. Cepas no mucoides: Cepa 2 (▲) y cepa 6 (●).

B. Cepas mucoides: Cepa 8 (▲) y cepa 9 (●).

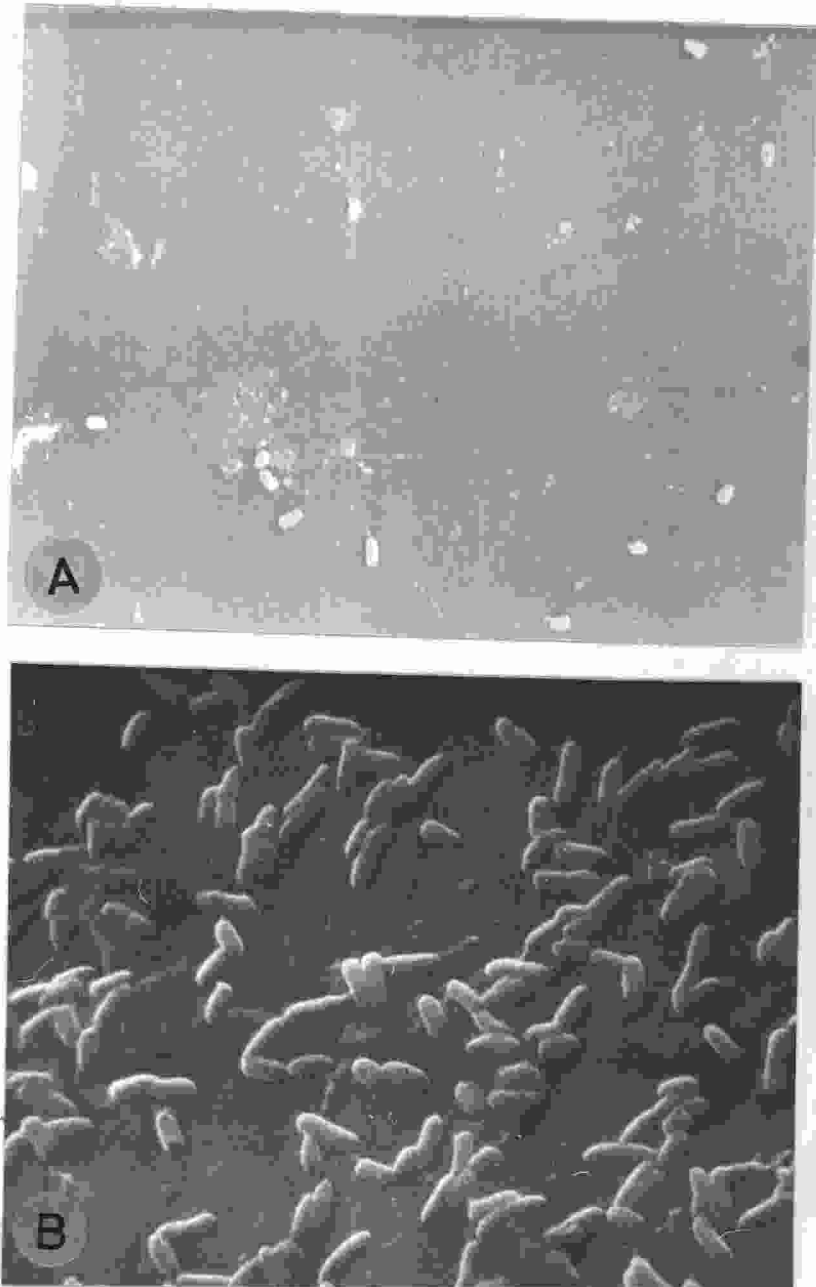


Figura 11. Adherencia de P.aeruginosa (cepa 2) a cloruro de polivinilo (PVC-2). A: 5 minutos (x 3000). B: 24 horas (x 4000).

El comportamiento de estas cepas (tanto mucoides como no mucoides) difiere de un biomaterial al otro. Considerando los datos globales de la adherencia, esta fue significativamente mayor ($p < 0.01$) a PVC-1 que a PVC-2, tanto a los 5 minutos como a lo largo de todo el ensayo, hasta los 7 días, salvo para las fases iniciales de interacción en el caso de la cepa 9. Estas diferencias son particularmente manifiestas en el caso de la cepa 2 donde la Adh_{max} a PVC-1 llega a ser 35 veces mayor que a PVC-2 (15.0×10^6 UFC/cm² frente a 0.43×10^6 UFC/cm²). Las diferencias en los valores de Adh_{max} en el resto de las 4 cepas estudiadas, siempre a favor de PVC-1, fueron de 2 (cepa 9) a 4 veces (cepas 6 y 8).

Adherencia a poliuretano.

La cinética de la adherencia de las cepas en estudio a catéteres de PUT se recoge en la Tabla 7 y las Figuras 9B, 12 y 13.

Como en el caso de PVC, la adherencia varió muy considerablemente en los momentos iniciales al comparar cepas mucoides y no mucoides. A los 5 minutos la adherencia de cepas mucoides a PUT osciló entre 0.0081×10^6 UFC/cm² (cepa 8) y 0.029×10^6 /cm² (cepa 7), mientras que en cepas no mucoides el rango fue de 0.1×10^6 UFC/cm² a 1.0×10^6 UFC/cm² ($p < 0.01$). Ello supone una proporción de 12-35 mayor en las cepas no mucoides.

Con PUT el comportamiento de las cepas mucoides fue muy similar al observado en la interacción con PVC: para la cepa 7 se alcanzó la Adh_{max} al segundo día (0.91×10^6 UFC/cm²) y tras esta sobrevino un descenso paulatino, alcanzándose cifras de adherencia a los 7 días de 0.67×10^6 UFC/cm²; en las 2 restantes cepas los valores de Adh_{max} se dieron a los 5 y 7 días, con cifras de 0.72×10^6 UFC/cm² (cepa 8) y 1.7×10^6

TABLA 7. Adherencia de *P.aeruginosa* (10^8 UFC/ml) a catéteres de poliuretano. Datos expresados en UFC x $10^6/cm^2$ de biomaterial.

CEPA TIEMPO	1	3	4	5	2	6	7	8	9	9R*
5 min.	0.32	0.10	0.48	0.23	0.8	1.0	0.029	0.0081	0.0098	0.19
15 min.	0.44	0.23	1.3	0.33	1.0	1.5	0.10	0.049	0.0096	0.40
30 min.	0.43	0.35	1.3	0.38	0.98	5.9	0.16	0.11	0.0098	0.66
60 min.	1.1	0.63	1.9	1.5	1.2	6.1	0.19	0.10	0.012	0.55
4 horas	3.9	2.1	1.6	2.3	3.5	1.1	0.22	0.14	0.030	0.99
8 horas	3.1	1.9	1.0	2.1	2.9	1.2	0.39	0.36	0.15	0.78
1 día	3.1	1.2	1.1	1.1	1.4	1.1	0.70	0.35	0.47	0.74
2 días	1.2	1.4	0.45	1.1	0.98	0.98	0.91	0.42	0.90	0.88
3 días	0.83	0.98	0.36	1.2	0.78	0.78	0.78	0.51	1.4	0.88
4 días	0.65	0.40	0.34	1.0	0.52	0.81	0.79	0.56	1.5	0.82
5 días	0.52	0.41	0.29	0.89	0.51	0.83	0.70	0.71	1.6	0.78
6 días	0.43	0.38	0.28	0.57	0.53	0.74	0.57	0.71	1.7	0.63
7 días	0.23	0.33	0.20	0.53	0.49	0.54	0.67	0.72	1.7	0.58

* Variante no mucoide de la cepa 9.

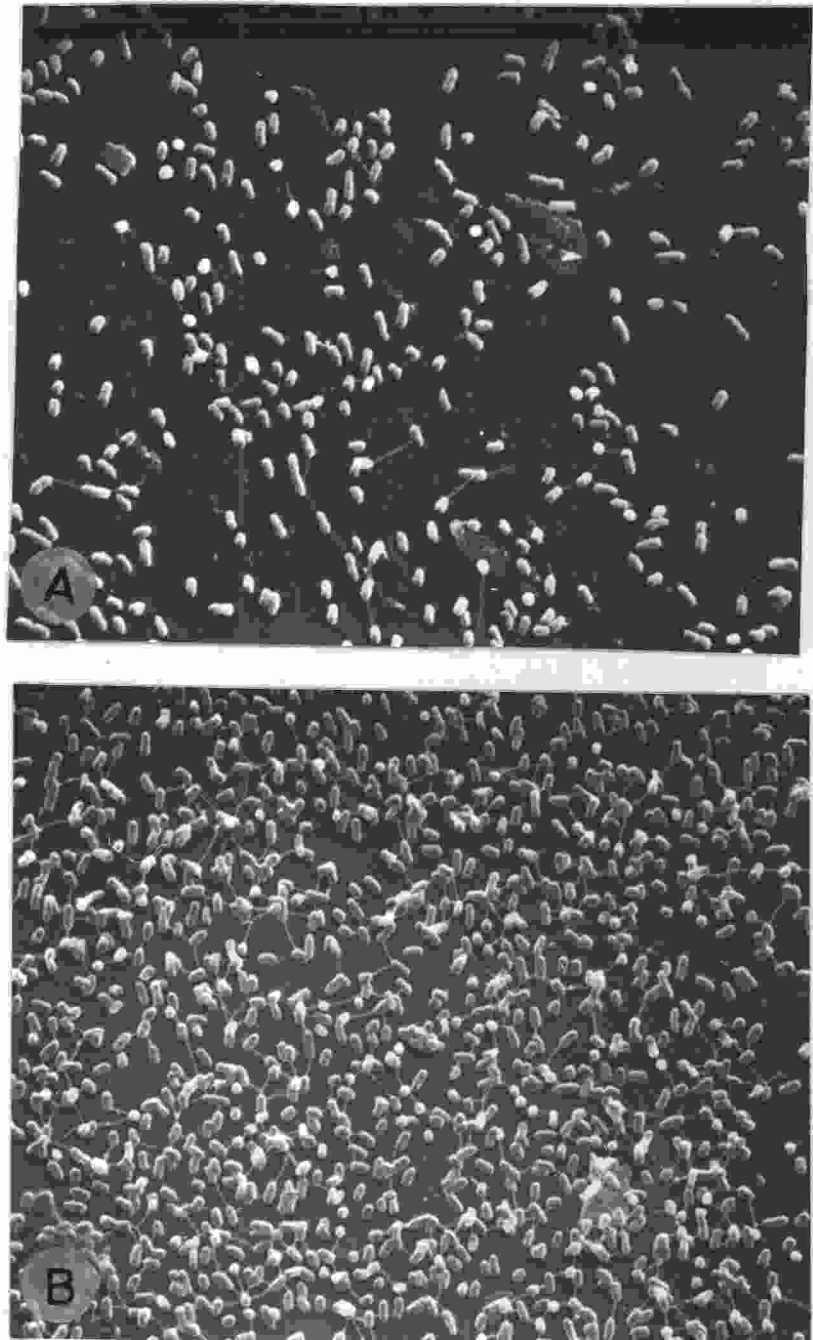


Figura 12. Adherencia de *P.aeruginosa* (cepa 2) a poliuretano. A: 5 minutos (x 2700) B: 24 horas (x 2400).

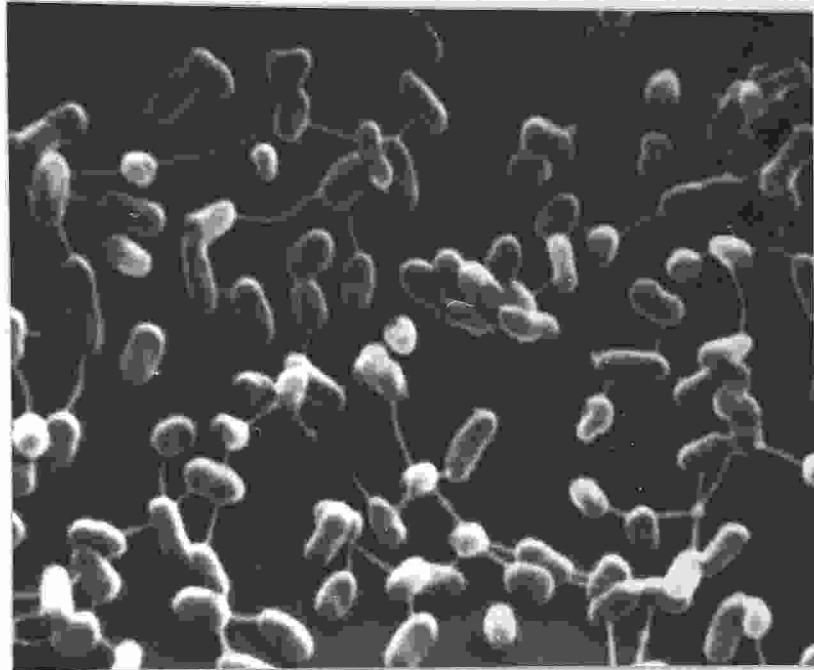


Figura 13. Adherencia de P.aeruginosa (cepa 2) a poliuretano, 24 horas (x 8000). Pueden observarse entre los microorganismos estructuras filamentosas correspondientes presumiblemente a puentes de "slime" deshidratados durante el proceso de preparación de la muestra.

UFC/cm² (cepa 9).

En las cepas no mucoides, las diferencias antes indicadas entre cepas hidrófilas e hidrófobas sólo fueron significativas ($p < 0.01$) a los 5 minutos: $0.28 \pm 0.16 \times 10^6$ UFC/cm² para cepas hidrófilas y $0.90 \pm 0.14 \times 10^6$ UFC/cm² para cepas hidrófobas. Ya a los 15 minutos la cepa 4 (hidrófila) presentó un valor (1.3×10^6 UFC/cm²) intermedio entre las de las dos cepas hidrófobas (1.0 y 1.5×10^6 UFC/cm²), siendo los valores globales de $0.66 \pm 0.57 \times 10^6$ UFC/cm² (cepas hidrófilas) y $1.25 \pm 0.35 \times 10^6$ UFC/cm² (cepas hidrófobas) ($p > 0.05$).

Con este biomaterial, y a diferencia de lo observado con PVC, el máximo de adherencia apareció a las 4 horas, aproximadamente (Figura 9B). El pico máximo correspondió a la cepa 6 (6.1×10^6 UFC/cm²) seguida de la 1 (3.9×10^6 UFC/cm²) y la 2 (3.5×10^6 UFC/cm²); los picos mínimos correspondieron a las cepas 4 (1.9×10^6 UFC/cm²), 3 (2.1×10^6 UFC/cm²) y 5 (2.3×10^6 UFC/cm²). Estos datos difieren significativamente ($p < 0.05$) de los observados con PVC-1; los valores de Adh_{max} fueron, por término medio, 2.7 veces mayores en este último caso.

La adherencia a PUT disminuyó en días sucesivos para alcanzar un mínimo en el día 7 ($0.35 \pm 0.14 \times 10^6$ UFC/cm²); estos valores mínimos también difirieron significativamente ($p < 0.05$) de los que se observaron con PVC-1 (Figuras 9A y 9B).

Adherencia de las variantes mucoide y no mucoide de una misma cepa.

Hemos estudiado la adherencia PVC-1 y PUT de la

variante mucoide (habitual) de la cepa 9 y de su variante no mucoide (9R). Los resultados de este ensayo aparecen en la Figura 14.

El comportamiento de la variante mucoide difiere del que se ha observado en la no mucoide; hemos comprobado que la variante no mucoide se adhiere a los dos biomateriales ensayados siguiendo un modelo cinético similar al de cepas no mucoides (cepas 1 a 6). A los 5 minutos el número de bacterias adheridas a PVC-1 fué de 0.17×10^6 UFC/cm² (no mucoide) frente a 0.010×10^6 UFC/cm² (mucoide) relación de (17: 1) ($p < 0.001$) mientras que a PUT fué de 0.19×10^6 UFC/cm² para la variante no mucoide y 0.0098×10^6 UFC/cm² para la mucoide (relación 19: 1) ($p < 0.01$). La Adh_{max} para la variante no mucoide fue de 2.0×10^6 UFC/cm² (PVC-1) y 0.99×10^6 UFC/cm² (PUT), y para la mucoide fue de 1.2×10^6 UFC/cm² (PVC) y 1.7×10^6 UFC/cm² (PUT); además la Adh_{max} de la variante no mucoide se alcanzó a los 2 días (PVC-1) y a las 4 horas (PUT) (tal y como ocurrió con las cepas habitualmente no mucoides), mientras que, en la variante mucoide, se logró a los 7 días (Figura 14).

Adherencia a látex siliconizado.

Los valores de la adherencia a catéteres LS se recogen en la Tabla 8 y las Figuras 9C y 15. Como se ha visto con PVC-1, PVC-2 y PUT las cifras correspondientes a cepas no mucoides han variado significativamente ($p < 0.01$) respecto a las de cepas no mucoides. A los 5 minutos la adherencia de cepas mucoides osciló entre 0.0098×10^6 UFC/cm² (cepa 9) y 0.011×10^6 UFC/cm², y en cepas no mucoides entre 0.1×10^6 y 0.84×10^6 UFC/cm². Estas diferencias han

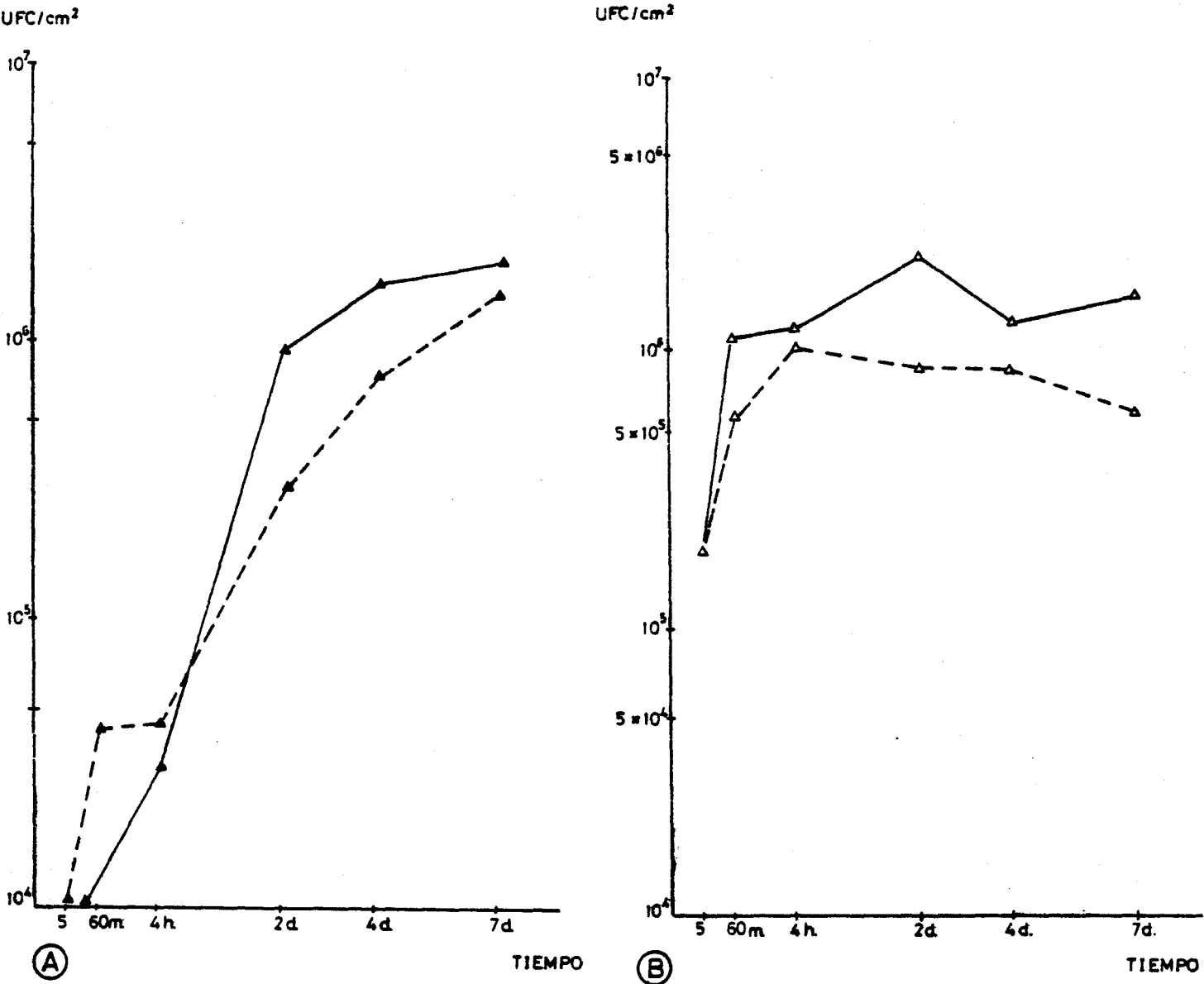


Figura 14. A: Adherencia de una cepa mucoides (cepa 9) de P.aeruginosa a cloruro de polivinilo (—) y a poliuretano (- - -). B: Id, Variante no mucoides de dicha cepa.

TABLA 8. Adherencia de P.aeruginosa (10^8 UFC/ml) a catéteres de látex siliconizado. Datos expresados en UFC x $10^6/cm^2$ de biomaterial.

CEPA TIEMPO	1	3	4	5	2	6	7	8	9
5 min.	0.42	0.10	0.16	0.36	0.59	0.84	0.011	0.031	0.0098
15 min.	1.2	0.16	0.67	1.0	1.9	1.7	0.034	0.056	0.0093
30 min.	2.2.	0.93	1.6	1.9	3.2	2.3	0.060	0.069	0.0098
60 min.	3.9	1.4	3.3	3.0	7.4	3.4	0.12	0.16	0.012
4 horas	5.8	3.1	3.6	3.2	7.1	3.5	0.16	0.60	0.029
8 horas	6.4	4.5	3.7	3.1	6.1	2.8	0.26	0.63	0.15
1 día	7.9	4.5	3.9	3.8	5.8	2.7	0.27	1.2	0.47
2 días	6.2	5.6	3.8	4.4	5.7	2.5	0.42	1.1	0.90
3 días	6.1	5.5	3.7	4.2	5.1	2.4	0.51	1.1	1.4
4 días	5.4	5.5	3.5	4.0	4.3	2.4	0.62	1.2	1.6
5 días	3.6	5.5	3.4	3.8	3.8	2.1	0.54	1.2	1.6
6 días	2.9	3.5	2.7	3.4	3.4	2.2	0.46	1.4	1.7
7 días	2.8	3.5	2.8	3.3	3.1	1.8	0.33	1.7	1.7

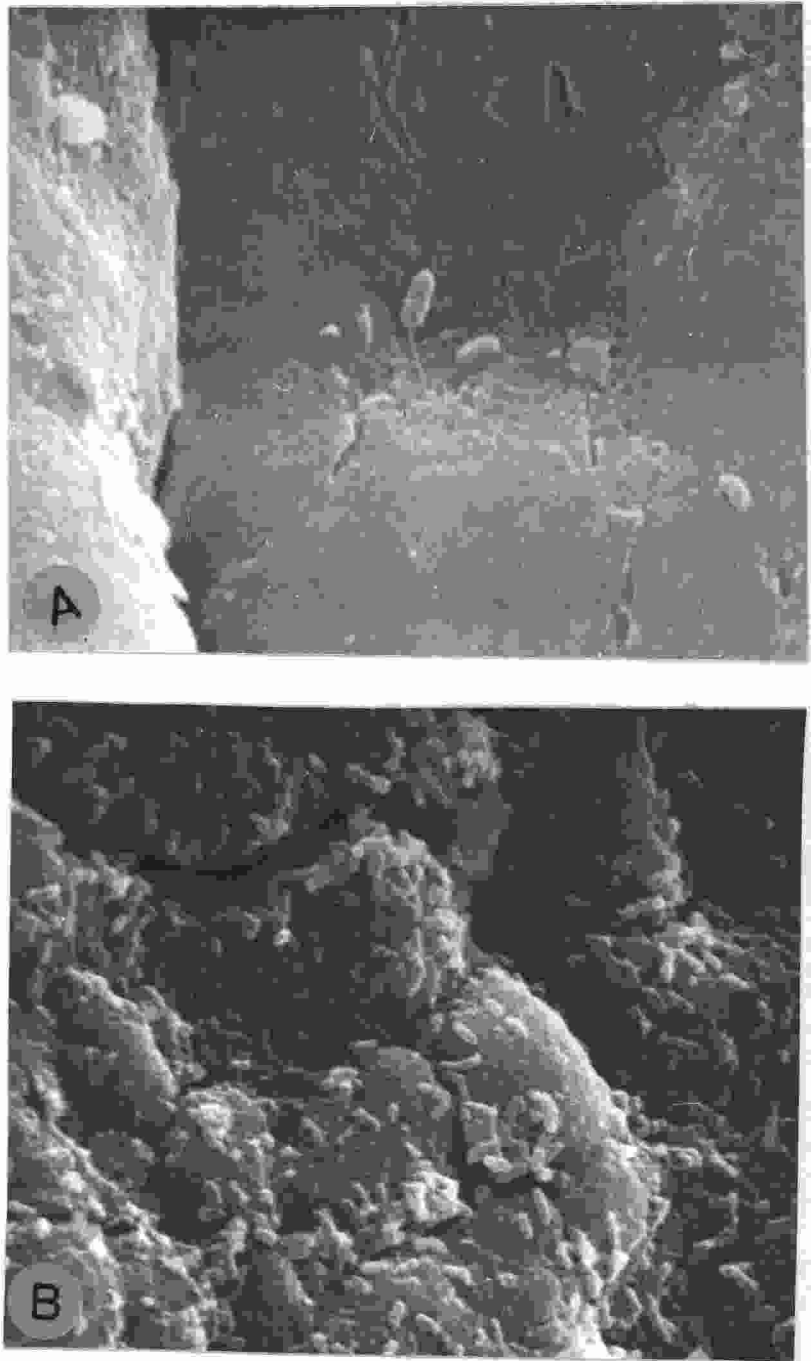


Figura 15. Adherencia de *P.aeruginosa* (cepa 2) a látex siliconizado. A: 5 minutos (x 6000). B: 24 horas (x 3500).

TABLA 9. Adherencia de 9 cepas de P.aeruginosa a 4 biomateriales: cloruro de polivinilo (PVC-1, PVC-2), poliuretano (PUT) y látex siliconizado (LS). Datos expresados en UFC x 10⁶/cm² de biomaterial.

	No mucoides (6 cepas)		Mucoides (3 cepas)	
Adh ₅ minutos	PVC-1	0.49 ± 0.14	0.031 ± 0.027	
	PVC-2	0.38 ± 0.05	0.027 ± 0.008	
	PUT	0.49 ± 0.35	0.016 ± 0.010	
	LS	0.41 ± 0.28	0.017 ± 0.012	
Adh _{max}	PVC-1	8.8 ± 6.7	1.10 ± 0.7	
	PVC-2	2.0 ± 0.5	0.59 ± 0.1	
	PUT	3.3 ± 1.6	1.1 ± 0.5	
	LS	5.4 ± 1.8	1.3 ± 0.6	
Adh ₇ días	PVC-1	5.0 ± 3.4	1.0 ± 0.7	
	PVC-2	0.46 ± 0.21	0.50 ± 0.27	
	PUT	0.35 ± 0.1	1.0 ± 0.6	
	LS	2.9 ± 0.6	1.2 ± 0.8	

continuado siendo significativas ($p < 0.01$) tanto en los valores máximos (0.62 a 1.7×10^6 UFC/cm² en mucoides y 3.5 a 7.4×10^6 UFC/cm² en no mucoides) como a los 7 días (0.33 a 1.7×10^6 UFC/cm² en mucoides y 1.8 a 3.5×10^6 UFC/cm² en no mucoides). La adherencia fue creciente hasta el día 7 en las cepas 8 y 9, y alcanzó su máximo en la cepa 7 al cuarto día (0.62×10^6 UFC/cm²) experimentando luego un descenso paulatino (0.33×10^6 UFC/cm² a los 7 días).

En cepas no mucoides, las diferencias observadas a los 5 minutos en la adherencia de cepas hidrófilas ($0.29 \pm 0.14 \times 10^6$ UFC/cm²) y cepas hidrófobas ($0.72 \pm 0.18 \times 10^6$ UFC/cm²) fueron significativas ($p < 0.05$). También hemos encontrado entre ambos grupos diferencias en el tiempo hasta que se alcanzó la Adh_{max}: 1 a 4 horas en las 2 cepas hidrófobas (3.5 y 6.1×10^6 UFC/cm²) y 1 a 2 días en las hidrófilas (1.9 a 3.9×10^6 UFC/cm²). Tras la Adh_{max} las diferencias en ambos grupos no han sido significativas ($p > 0.05$).

En la tabla 9 se recogen, resumidamente, los datos sobre la comparación de los 3 parámetros que hemos considerado más indicativos de la cinética de adherencia: Adherencia inicial (Adh_{5 minutos}), Adherencia máxima (Adh_{max}) y adherencia final (Adh_{7 días}) para el conjunto de cepas no mucoides y mucoides en relación con los distintos biomateriales estudiados.

Los resultados de la adherencia de bacterias crecidas en presencia de $1/4 \times$ CMI de varios antimicrobianos (amicacina, ceftazidima y ciprofloxacina) quedan recogidas en las Figuras 16 y 17; este efecto ha sido estudiado escogiendo la cepa 2, cepa no mucoides con gran capacidad de adherencia a los biomateriales que hemos utilizado.

Los valores de adherencia a PVC-1 en bacterias crecidas en medio sin antimicrobiano fueron de $9.8 \pm 3.0\%$ (1 hora) $34.4 \pm 0.6\%$ (4 horas) y $39.0 \pm 1.6\%$ (3 días). El valor de la adherencia no se afectó ($p > 0.05$) por la preincubación con AK ($15.0 \pm 0.4\%$ a 1 hora y $42.4 \pm 3.0\%$ a los 3 días); sí lo hizo con CZ a la hora ($8.0 \pm 0.6\%$) y a las 4 horas ($21.4 \pm 4.4\%$) y con CF durante todo el período de estudio ($5.6 \pm 2.2\%$ a la hora, $17.2 \pm 3.5\%$ a las 4 horas y $31.2 \pm 1.0\%$ a los 3 días) (Figura 16A).

Estos resultados han sido absolutamente superponibles en la adherencia a catéteres de látex siliconizado (Figura 16B).

Cuando hemos estudiado la adherencia a otro catéter de cloruro de polivinilo (PVC-2) ciprofloxacina ejerció un efecto inhibitor, hasta el primer día (controles: $4.9 \pm 0.4\%$ a la hora, $11.7 \pm 1.3\%$ a las 4 horas y $10.6 \pm 1.3\%$ al día 1, frente a $2.9 \pm 0.2\%$, $8.3 \pm 0.7\%$ y $6.4 \pm 0.6\%$ respectivamente para bacterias crecidas en presencia de $1/4 \times$ CMI de ciprofloxacina). A los 3 días este efecto ya no fue significativo ($p > 0.05$) (control: $12.6 \pm 0.9\%$ y $12.2 \pm 1.9\%$ para ciprofloxacina). La inhibición de la adherencia sólo se observó con ceftazidima hasta las 4 horas ($3.0 \pm 0.4\%$ a la hora, $8.8 \pm 0.4\%$ a las 4 horas y $9.5 \pm 0.8\%$ al día 1) y en ningún momento con amicacina (Figura 17A).

No hemos observado una inhibición de la adherencia a catéteres de poliuretano (Figura 17B) con ninguno de los antimicrobianos estudiados.

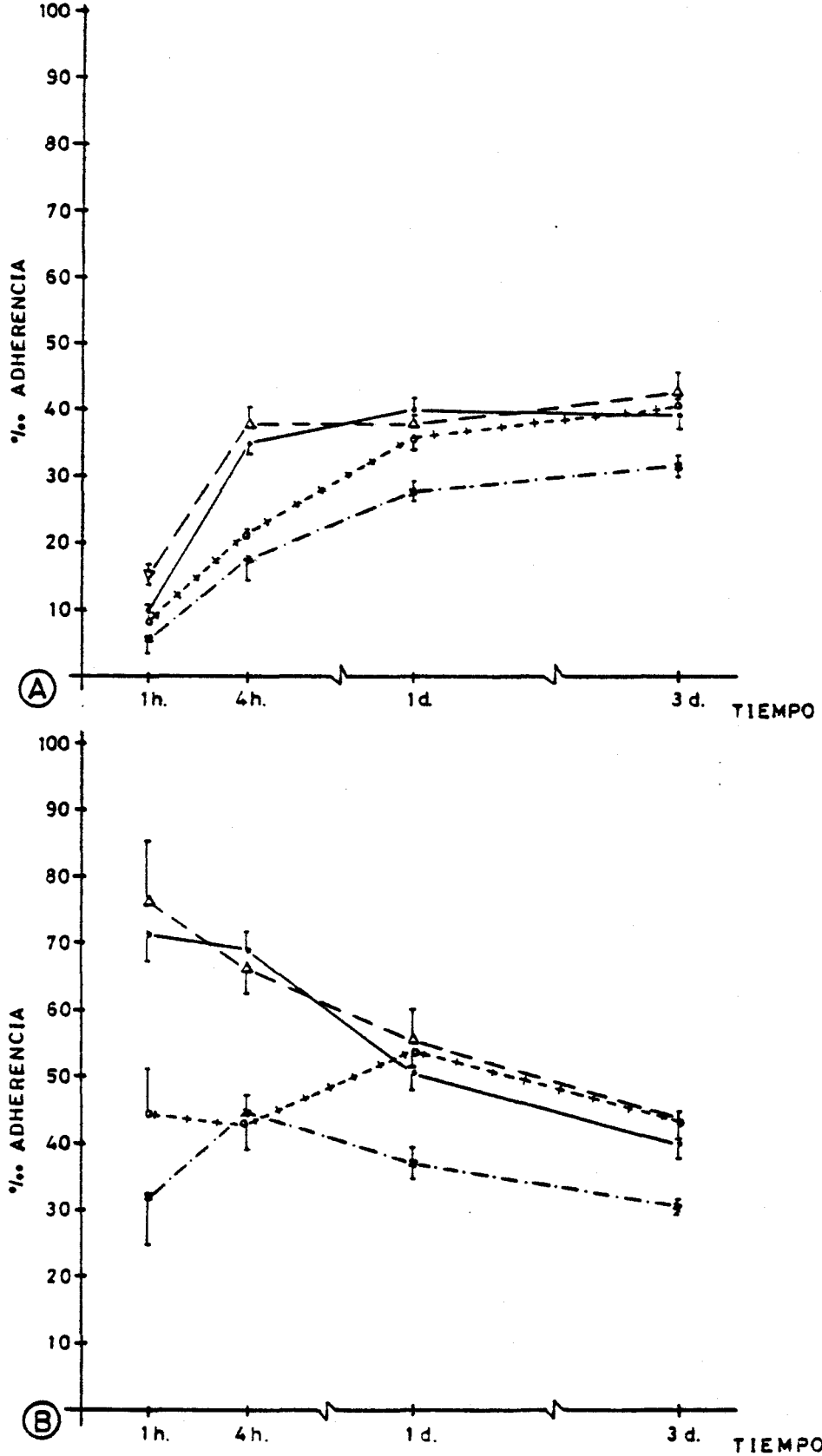


Figura 16. Adherencia de *P.aeruginosa* (cepa 2) a cloruro de polivinilo (PVC-1) (16A) y a látex siliconizado (16B). Bacterias crecidas en presencia de 1/4 x CMI de ampicacina (▲—▲), ceftazidima (⊕--+⊕) y ciprofloxacina (*---*). Control sin antimicrobiano (●—●).

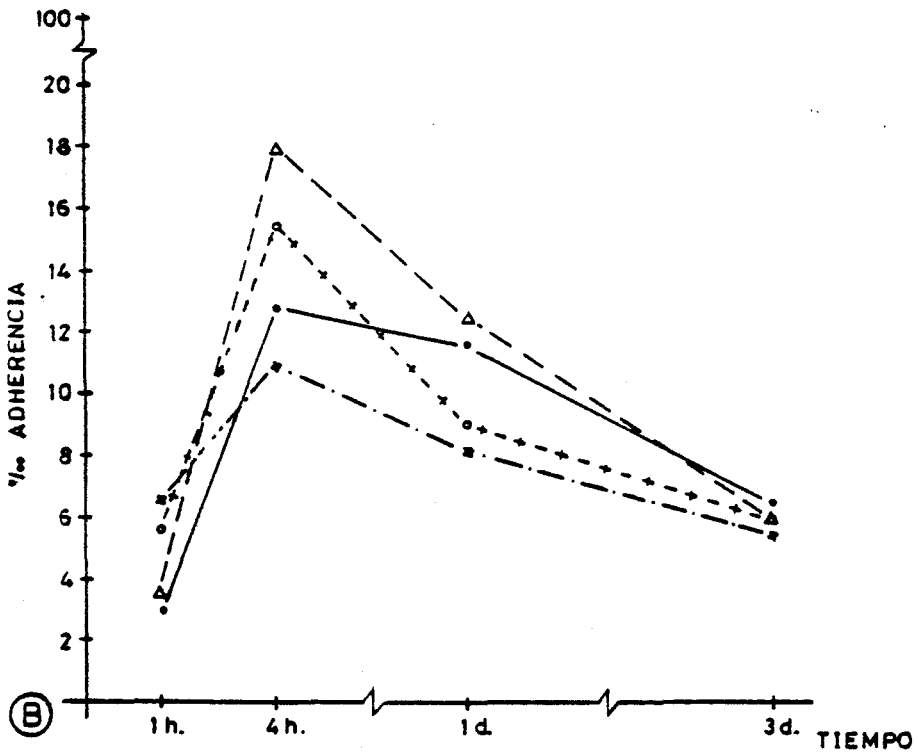
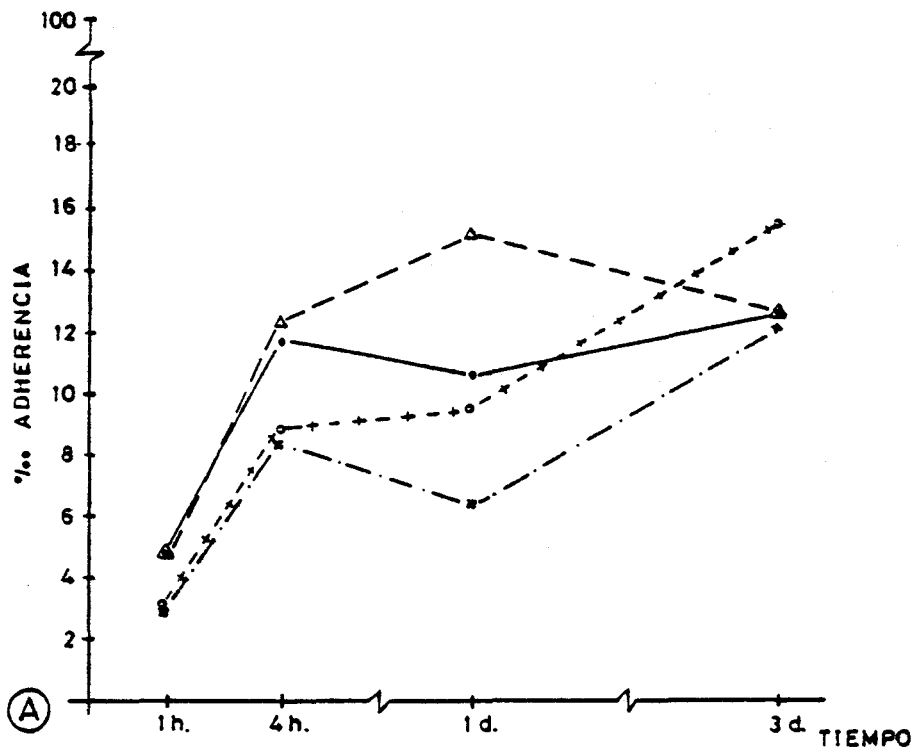


Figura 17. Adherencia de *P.aeruginosa* (cepa 2) a cloruro de polivinilo (PVC-2) (17A) y a poliuretano (17B). Bacterias crecidas en presencia de $1/4$ x CMI de ampicacina (Δ — Δ), ceftazidima y ($+--+$) y ciprofloxacina ($x--x$). Control sin antimicrobiano (\bullet — \bullet).

EFFECTO DEL BIOMATERIAL EN LA SUPERVIVENCIA DE P.AERUGINOSA.

Al incubar una suspensión de P.aeruginosa, conteniendo 1×10^8 UFC/ml, en presencia y en ausencia de los diferentes biomateriales, la supervivencia de los microorganismos fue diferente en unos casos que en otros, observándose también diferencias entre las cepas mucoides y no mucoides. Vamos a analizar en primer lugar los datos relativos a estas últimas (Figura 18). En una suspensión control de P.aeruginosa (sin biomaterial), y partiendo de una concentración inicial de 1×10^8 UFC/ml, en una primera fase hubo un mantenimiento del número de bacterias viables en torno a esta cifra, con un máximo a los 2 días de $1.13 \pm 0.22 \times 10^8$ UFC/ml, para iniciar un descenso continuando a partir de los 5 días ($0.88 \pm 0.25 \times 10^8$ UFC/ml) hasta los 10 días ($0.48 \pm 0.26 \times 10^8$ UFC/ml).

Hemos observado un comportamiento muy similar cuando en la suspensión se pusieron fragmentos de PVC-2 ($0.88 \pm 0.05 \times 10^8$ UFC/ml a los 2 días, $0.73 \pm 0.03 \times 10^8$ UFC/ml a los 5 días y $0.51 \pm 0.18 \times 10^8$ UFC/ml a los 10 días).

También con catéteres de PUT hemos observado un modelo de supervivencia semejante, si bien el descenso en el mismo de UFC/ml viables ha sido más paulatino ($1.08 \pm 0.32 \times 10^8$ a los 5 días y $0.72 \pm 0.25 \times 10^8$ a los 10 días).

La influencia del PVC-1 y LS en la viabilidad bacteriana ha sido, por el contrario, significativamente diferente respecto al control sin biomateriales (Figura 18). En caso de PVC-1 las diferencias se inician ya en el primer día ($1.22 \pm 0.16 \times 10^8$ UFC/ml) ($p > 0.01$), manteniéndose a lo largo de todo el período

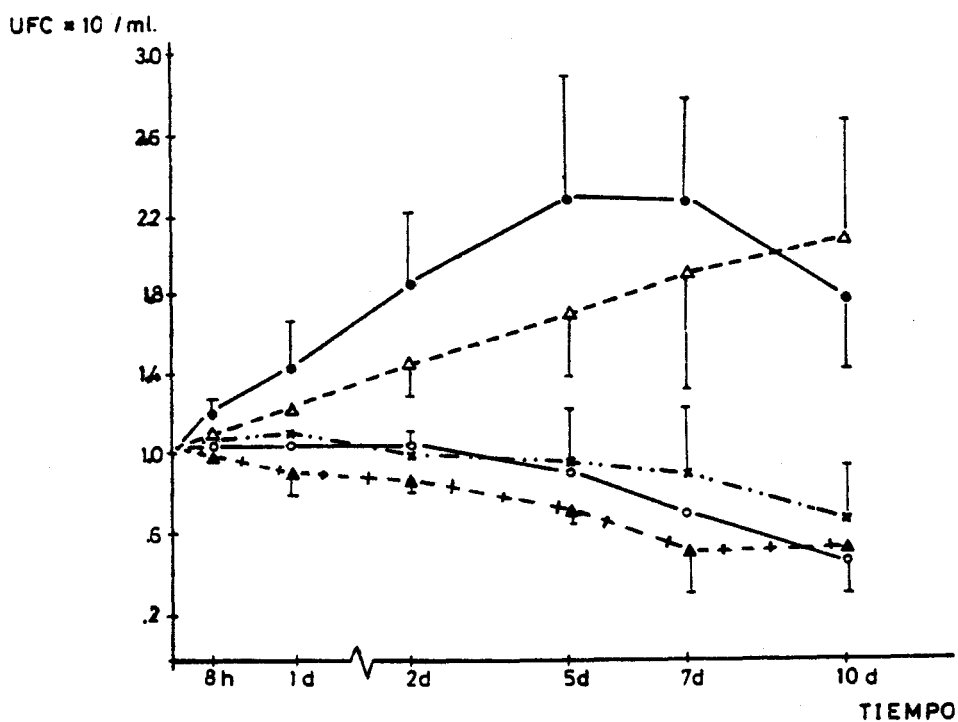


Figura 18. Valores medios de las cifras de supervivencia de seis cepas no mucoides de *P.aeruginosa* en suspensiones que contienen segmentos de cloruro de polivinilo, 2 tipos PVC-1: (△---△), y PVC-2: (▲---▲), poliuretano (×---×) y látex siliconizado (●—●), comparada con la de control sin biomateriales (○—○).

de estudio ($1.72 \pm 0.43 \times 10^8$ UFC/ml a los 5 días y $2.1 \pm 0.7 \times 10^8$ a los 10 días). La influencia del LS se manifestó de un modo similar existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control sin bio-terial, (2 días: $1.85 \pm 0.41 \times 10^8$ UFC/ml; 5 días $2.23 \pm 0.74 \times 10^8$ UFC/ml), si bien tras los 5 días, y a diferencia de lo apreciado con PVC-1, se inició un lento descenso en el número de bacterias viables ($2.18 \pm 0.57 \times 10^8$ UFC/ml a los 7 días y $1.80 \pm 0.43 \times 10^8$ UFC/ml a los 10 días).

En las Figuras 19 y 20 se recoge la evolución de la supervivencia de las cepas mucoides. A lo largo del período de estudio hemos observado una disminución progresiva en el número de variantes mucoides viables, independientemente de la existencia o no de biomaterial (Figura 19). En cambio, la aparición de variantes no mucoides ha mostrado diferencias en relación con el biomaterial estudiado (Figura 20).

Estudiando la cepa 9, hemos comprobado que en el control sin biomaterial las colonias no mucoides aparecieron hacia el día quinto, manteniéndose siempre en cifras inferiores a las de variantes mucoides; a los 10 días, tan sólo existían $0.5 \pm 0.22 \times 10^8$ UFC/ml de bacterias no mucoides. Hemos observado una situación similar cuando se colocaron en la suspensión segmentos de PUT o de PVC-2. Por el contrario, tanto PVC-1 como LS favorecieron la aparición rápida de variantes no mucoides, ya al primer día (PVC-1: $0.67 \pm 0.47 \times 10^8$ UFC/ml; LS: $0.27 \pm 0.21 \times 10^8$ UFC/ml), (diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.01$) Los catéteres de LS favorecieron el incremento, en días sucesivos, con respecto a los de PVC-1 ($1.8 \pm 0.74 \times 10^8$ UFC/ml para LS y $1.03 \pm 0.65 \times 10^8$ UFC/ml para PVC-1 a los 10 días).

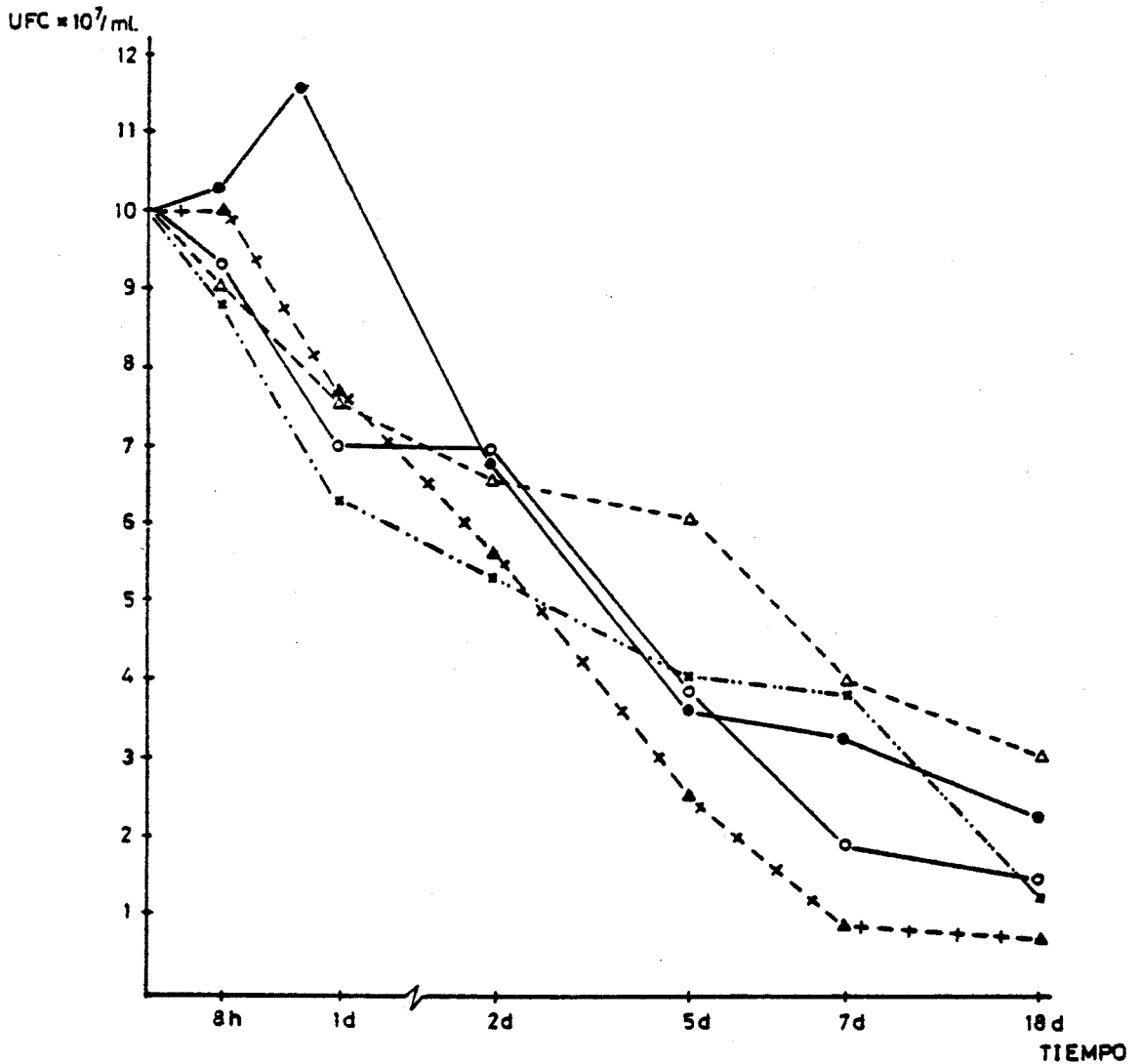


Figura 19. Valores medios de la persistencia de las variantes mucoides (cepas 7, 8 y 9) de P.aeruginosa en suspensiones con segmentos de cloruro de polivinilo, 2 tipos (PVC-1, Δ ---- Δ ; PVC-2, \blacktriangle -+- \blacktriangle), poliuretano (*---*) y látex siliconizado (●—●) comparada con la de un control sin biomateriales (○—○).

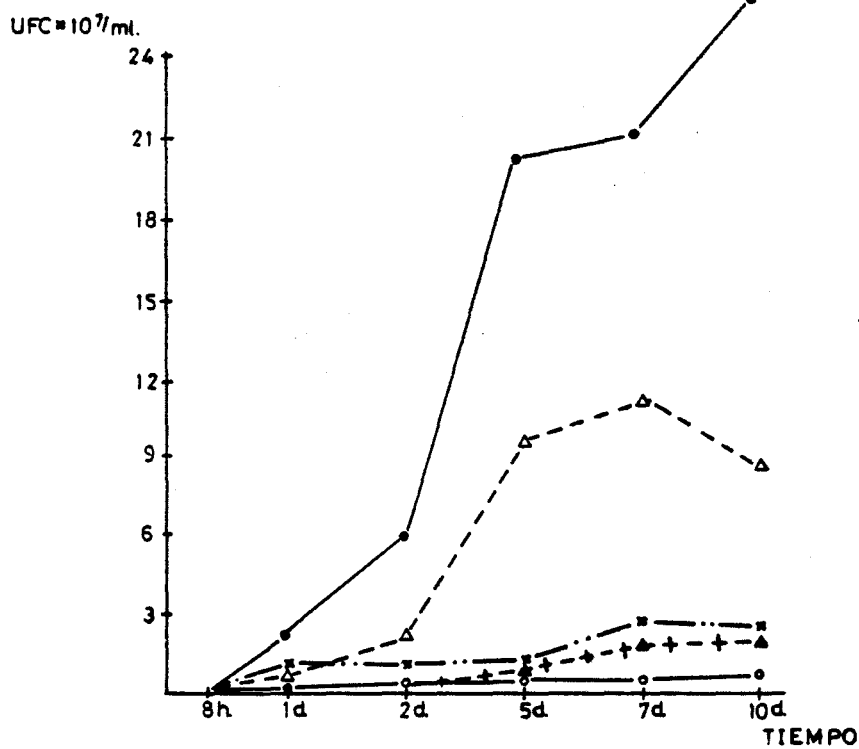


Figura 20. Efecto del biomaterial en la aparición de variantes no mucoides a partir de una cepa mucóide de P.aeruginosa (cepa 9).
 Biomateriales: cloruro de polivinilo, 2 tipos (PVC-1, Δ --- Δ y PVC-2 \blacktriangle +-- \blacktriangle); poliuretano (\ast --- \ast) y látex siliconizado (\bullet — \bullet). Control sin biomaterial: (\circ — \circ).

Comprobamos, finalmente, si la liberación de componentes de los catéteres de PVC-1 y LS se producía espontáneamente o era necesario la acción de P.aeruginosa, observando que cuando se tienen fragmentos de estos catéteres en un medio líquido sin nutrientes convencionales y sin P.aeruginosa en suspensión, durante 7 días, el sobrenadante permite que un inóculo inicial de 10 UFC/ml. de P.aeruginosa (cepa 2) ascienda a las 24 horas a 0.46×10^8 UFC/ml. (con PVC-1) y a 1.1×10^8 UFC/ml. (con LS), frente a las 0.36×10^6 UFC/ml. de un control donde no se pusieron catéteres; a las 48 horas estas cifras fueron de 0.9×10^8 UFC/ml. (PVC-1), 4.4×10^8 (LS) y 0.86×10^6 (control), lo que supone un número de bacterias viables entre 100-130 (PVC-1) y 300-500 (LS) veces mayor en los frascos que contenían los fragmentos de catéter que en los que no los contenían.

DISCUSSION

Los microorganismos del género Pseudomonas no han sido considerados patógenos importantes hasta hace poco tiempo. La importancia creciente de los bacilos gramnegativos y de P.aeruginosa en particular se debe en parte a los avances terapéuticos frente a S.aureus y otros cocos grampositivos y en parte a la aparición de soluciones terapéuticas para pacientes (enfermos con cáncer, grandes quemados,...) en otro tiempo irrecuperables (3).

En la medicina actual cada vez son más frecuentes las maniobras invasivas; el empleo de cánulas, catéteres intravenosos, sondas urinarias,... es hoy día rutinario en la mayoría de los hospitales, y aunque todos estamos de acuerdo en su necesidad, la misma supone un riesgo elevado de aparición de infecciones. Se ha calculado que en EEUU un 5% de los pacientes ingresados en un hospital desarrollan una infección nosocomial (87) y que un 45% de estas infec-

ciones están relacionadas con el empleo de dispositivos médicos diversos (56).

El hábitat natural de P.aeruginosa hace que sea un microorganismo particularmente importante en el medio hospitalario. En conjunto este microorganismo representa la tercera causa de infección nosocomial tras E.coli y Klebsiella pneumoniae (87); y de entre los gramnegativos P.aeruginosa es la segunda causa de neumonías y de infecciones urinarias nosocomiales (88, 89) y la cuarta de bacteriemia asociada a catéteres intravenosos (90). La facilidad de P.aeruginosa para adherirse a superficies sólidas (20, 21, 49) favorece la colonización de pacientes cateterizados o sondados, en los que por su enfermedad basal las alteraciones inmunológicas son relativamente comunes.

En los últimos años se viene trabajando en el estudio de la adherencia bacteriana a biopolímeros empleados en la fabricación de dispositivos de uso médico. Obviamente los microorganismos sobre los que se han realizado estos estudios son aquellos más claramente relacionados con el ambiente hospitalario. La mayoría de estos trabajos han sido realizados con Staphylococcus (37, 40, 62-68); hasta la fecha hay muy pocos estudios con P.aeruginosa y catéteres (62, 82), por ello hemos elegido este microorganismo para nuestro trabajo.

Aun cuando la identificación de P.aeruginosa es bastante fácil en el laboratorio de Microbiología Clínica (7), hemos realizado la identificación de nuestras cepas mediante un sistema comercial (API 20 NE) con objeto de obtener, además, los biotipos de cada una.

En principio los biotipos obtenidos podrían ser un

dato de interés en el estudio del comportamiento de diferentes cepas de P.aeruginosa. Los resultados obtenidos, sin embargo, nos hacen observar la ausencia de correlación entre biotipos concretos y alguno de los aspectos que hemos incluido en este estudio (sensibilidad a antimicrobianos, hidrofobicidad de superficie, producción de "slime", adherencia a biomateriales).

La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos usados (amicacina, ceftazidima, imipenema, ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina) ofreció resultados de CMI y CMB muy similares, dada la actividad bactericida de los mismos. Como puede observarse hemos querido introducir en el estudio representantes de las tres familias de antimicrobianos más importantes actualmente frente a P.aeruginosa: aminoglucósidos, betalactámicos y quinolonas.

De entre las fuerzas inespecíficas que favorecen la adherencia bacteriana a la superficie de células y biomateriales, se ha prestado especial atención a la HS. Los estudios sobre HS han demostrado que un alto valor de la misma favorece la asociación de un microorganismo con un sustrato hidrófobo (49, 51-55).

Se han diseñado varios métodos para la determinación de la HS bacteriana (84, 91-93); hemos empleado por su sencillez el de afinidad a p-xileno (84). Los valores de HS que hemos obtenido en las cepas de P.aeruginosa muestran una ausencia de cepas estrictamente hidrófobas o hidrófilas, lo que sí se ha observado en otras especies como S.epidermidis (67); sólo dos de nuestras nueve cepas mostraron cierto grado de hidrofobicidad, inferior al 50%; el estudio de la HS en cepas mucoides tampoco ha deparado un patrón particular y las tres cepas estudiadas eran más bien

hidrófilas, con una HS entre 20% y 25%. Estos valores coinciden con los obtenidos en P.aeruginosa por Speert y cols. (19) que presentan cifras de HS entre un 15% y un 65% usando un sistema bifásico polietilenglicol-dextrano, de similar fundamento al usado por nosotros.

Las dos cepas más hidrófobas se aislaron de sangre y orina; las siete restantes de infecciones de heridas (dos cepas) o de muestras del tracto respiratorio (de ellas, tres procedían de pacientes con fibrosis quística y las restantes de enfermos sin evidencias de neumonía). El número de cepas estudiado es demasiado bajo para establecer con fiabilidad que las cepas más hidrófobas son las que poseen mayor capacidad invasiva; en otro estudio realizado en nuestro laboratorio (Suárez y cols, Enf. Infec. Microbiol. Clin. 1988, aceptado y pendiente de publicación) con una serie de cinco cepas procedentes de sangre y de orina no se ha observado una correlación con valores de HS particularmente elevados; los datos obtenidos por Ljungh y cols. (54) estudiando cepas de P.aeruginosa procedentes de enfermos con infección urinaria tampoco son concluyentes: de las 17 cepas estudiadas 15 eran hidrófobas por el método de agregación a sales pero sólo 2 lo eran cuando se empleaba la cromatografía de interacción hidrofóbica; las diferencias (probablemente debidas al efecto de la carga eléctrica de superficie en el método de agregación a sales) dificultan la interpretación de estos resultados.

Estudios previos (53, 94, 95) han demostrado que la HS puede variar, en una misma cepa, en función de las circunstancias en que esta haya crecido. Nuestros datos nos han permitido comprobar que la expresión de la HS no varía significativamente al comparar cepas que han crecido en reposo o en agitación.

Algunos autores han observado (85) que para E.coli la adición de sulfato amónico a la suspensión bacteriana donde se determina la HS puede aumentar los valores obtenidos. Hasta la fecha no se había investigado este particular en P.aeruginosa; en nuestras cepas hemos comprobado que esta modificación técnica tampoco varía el valor de la HS.

Otro de los factores capaces de modificar la HS es la exposición bacteriana a concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos (43, 96). El crecimiento de las nueve cepas que hemos estudiado en presencia de 1/4 x CMI de amicacina, ceftazidima, imipenema, ciprofloxacina, norfloxacin y ofloxacin durante 18 horas tampoco ha modificado los valores de la HS en comparación con los de un control sin antimicrobianos.

Los datos de la literatura sobre la acción de concentraciones subinhibitorias en la expresión de la HS indican la existencia de variaciones dependientes de la especie considerada. Schadow y cols. (97) no han observado en estafilococos coagulasa negativa variaciones en la HS inducidas por el pretratamiento con vancomicina, clindamicina, eritromicina y norfloxacin, pero sí una disminución inducida por cefalotina, cloramfenicol, netilmicina, novobiocina, imipenema y gentamicina. En E.coli Klein y cols. (98) observaron un aumento de la HS de las cepas crecidas en presencia de betalactámicos y una disminución cuando se trataba de fosfomicina. Aun dentro de una misma especie (estafilococos coagulasa negativa, Neisseria gonorrhoeae), se han descritos variaciones dependientes de cepas (96, 97).

También se ha observado que la interacción de las proteínas plasmáticas con las bacterias puede

determinar una modificación en la HS: la albúmina es capaz de transformar cepas hidrófobas de estafilococos coagulasa negativa en hidrófilas, interfiriendo con la capacidad de adherencia a biomateriales (67). Cuando hemos estudiado la interacción entre suero humano y dos de nuestras cepas de P.aeruginosa, una hidrófoba y otra hidrófila, hemos apreciado que en la cepa hidrófoba se producía un descenso de la HS.

Un factor importante en la adherencia de P.aeruginosa a sustratos sólidos es la producción de "slime". El método que hemos aplicado para su estudio fue descrito originalmente para evaluar esta propiedad en estafilococos coagulasa negativa (86), y posteriormente otros autores lo han usado en P.aeruginosa (42). El hecho de que en nuestras cepas mucoides el resultado haya sido negativo nos hace pensar que la fiabilidad del método en esta especie debería considerarse, cuando menos, dudosa. La composición del "slime" en P.aeruginosa es bien conocida (23) y presumiblemente está poco relacionada con la del "slime" de Staphylococcus (99).

La existencia de otros métodos para la detección de "slime" en P.aeruginosa basados en la microscopía electrónica (20, 21, 42, 82), ensayos bioquímicos (30), estudio de la interfase aire-medio líquido de un cultivo en agitación (25), o un ensayo en placa de microtitulación utilizando un medio especial (33) podrían representar alternativas de interés a la técnica modificada de Christensen y cols. para detectar "slime" en P.aeruginosa, pero tampoco han sido evaluados hasta la fecha.

Como modelo de estudio de la interacción entre P.aeruginosa y una superficie plástica hemos elegido el poliestireno, material que ya ha sido utilizado en

otros estudios (97, 100). Habiendo observado en nuestras nueve cepas la existencia de cepas hidrófilas y de cepas relativamente hidrófobas, hemos elegido una de cada tipo para el estudio de esta interacción.

Los resultados obtenidos indican que la adherencia a esta superficie está favorecida en la cepa más hidrófoba durante las fases iniciales, incluso hasta las primeras 4 horas.

La disminución de los valores de HS en la cepa hidrófoba determinada por la preincubación de la misma en suero también se ha asociado con un descenso en la adherencia a poliestireno (Figura 5B), situación que no hemos observado en la cepa hidrófila, donde la HS no se redujo por dicha preincubación (Figura 5A). Estos dos hechos sugieren que al menos en algunas cepas de P.aeruginosa la HS debe ser un factor importante en las primeras fases de la adherencia a un sustrato sólido.

Cuando transcurrió un tiempo mayor (≥ 8 horas) la cepa menos hidrófoba llegó a alcanzar valores de adherencia similares (diferencias estadísticamente no significativas) a los de la cepa más hidrófoba; además existe otro hecho clave para una justa valoración de la importancia de la HS en la adherencia de P.aeruginosa: aunque ninguno de los seis antimicrobianos estudiados produjo modificaciones significativas de la HS, sí que indujeron una disminución de la adherencia, muy especialmente en los primeros momentos (5 minutos), y en algunos casos (ciprofloxacina y ceftazidima) incluso a las 8 horas. Por tanto, hemos de pensar que aun cuando la HS es un factor importante en las primeras fases de la adherencia, deben existir otros muchos factores (carga neta de superficie, producción de "slime",...) asociados a cepas o a subpoblaciones particulares dentro de una misma especie que también

favorecen la adherencia a una superficie sólida.

Los resultados del efecto de concentraciones sub-inhedoras en la adherencia de P.aeruginosa a poliestireno los hemos utilizado como criterio de elección de un antimicrobiano de cada familia (aminoglucosidos, betalactámicos y quinolonas) para un posterior ensayo empleando biomateriales de uso clínico.

Tras estudiar el modelo general de adherencia a poliestireno hemos centrado nuestro trabajo en la interacción de P.aeruginosa con tres biomateriales de uso clínico habitual: cloruro de polivinilo, poliuretano y látex siliconizado.

Diversos trabajos (42, 65, 100, 101) demuestran el diferente comportamiento de una misma cepa frente a biomateriales diferentes: S.epidermidis se adhiere más a politetrafluoroetileno-cohexafluoro-propileno que a acetato de celulosa (100); Enterobacteriaceae (E.coli, Salmonella enteritidis, Proteus mirabilis) lo hacen más a Dacron que a Teflon (65); Candida spp. se adhiere más a cloruro de polivinilo que a Teflon (101) y P.aeruginosa más a polímeros no iónicos que a polímeros iónicos (42).

Se han observado también diferencias en la adherencia de P.aeruginosa a dos biomateriales con el mismo polímero base (42), por ello elegimos para nuestro estudio dos catéteres de cloruro de polivinilo (que hemos denominado PVC-1 y PVC-2) procedentes de casas comerciales distintas; la composición exacta de estos dos catéteres no fue suministrada por las casas comerciales correspondientes, que sólo especifican el polímero base de los mismos (PVC); sin embargo la propia naturaleza física de los dos catéteres denota la

existencia de variaciones en la composición final de los mismos: los catéteres de PVC-1 era flexibles y blandos al corte, exactamente al revés de lo que ocurre con los de PVC-2; presumiblemente los catéteres de PVC-1 poseen una mayor proporción de flexibilizantes que los de PVC-2.

Hemos realizado nuestro trabajo empleando bacterias crecidas en medio líquido (TSB) e incubadas luego en una solución de PBS con los distintos biomateriales; P.aeruginosa se mantiene viable en PBS, lo que asegura el mantenimiento de una población lo más homogénea posible durante el período de estudio; por otra parte, puesto que en muchos de los trabajos publicados sobre el tema (42, 63, 65, 67, 71, 100, 102) también se ha usado PBS, nuestros resultados serán más fácilmente comparables con los de otros autores.

En nuestra opinión, los dos factores claves a resaltar en este estudio son las propiedades particulares de las cepas estudiadas y la naturaleza y características de los biomateriales considerados.

La adherencia a todos los biomateriales estudiados siguió patrones distintos en las cepas mucoides y en las no mucoides.

En las cepas no mucoides la adherencia fue creciendo a lo largo del tiempo hasta alcanzar un valor máximo (Adh_{max}) cuyas cifras han variado según la cepa y el biomaterial considerado. Tras ese momento el número de bacterias adheridas fue paulatinamente descendente, alcanzando sus valores más bajos al final del período de estudio (7 días).

En el caso de cepas mucoides la adherencia creció paulatinamente en días sucesivos alcanzando sus valores

máximos a los 7 días, pero con valores muy cercanos a la Adh_{max} a partir de los días tercero o cuarto. Además, los valores finales de adherencia de estas cepas mucoides a PUT fueron mayores que los de cepas no mucoides.

También hemos observado que en las cepas no mucoides las cifras de adherencia a los 5 minutos se relacionan directamente con el grado de hidrofobicidad de superficie, comprobando que en las cepas más hidrófobas la adherencia fue mayor que en las menos hidrófobas. Estos datos concuerdan con lo que se ha descrito en la literatura para S.epidermidis (67) y con lo que previamente observamos en el modelo de interacción con poliestireno.

Ya hemos indicado antes, a propósito de la adherencia a poliestireno, la existencia de evidencias que indican que la HS es sólo un factor más en la capacidad de adherencia de P.aeruginosa a superficies sólidas, ahora hemos de reafirmar este hecho, puesto que en la interacción con los biomateriales estudiados las cifras de bacterias adheridas, en principio mayores en las cepas más hidrófobas se van igualando paulatinamente en cepas hidrófobas y en cepas hidrófilas, e incluso la adherencia llega a ser mayor en cepas con menor HS (cepas 1 y 3, Tablas 6, 7 y 8).

El distinto comportamiento entre cepas mucoides y no mucoides se confirma por el estudio realizado con las variantes mucoide y no mucoide de la cepa 9; al analizar la adherencia de ambas a los dos biomateriales, PVC-1 y PUT, a los que se produjeron las cifras de mayor y menor adherencia, respectivamente, comprobamos que la variante no mucoide se comporta de forma absolutamente distinta a como lo hace la forma mucoide y de un modo muy similar al del resto de cepas

habitualmente no mucoides (Tablas 7 y 8).

Todos estos datos apoyan experimentalmente, pues, los puntos básicos de la teoría propuesta para explicar la colonización de superficies sólidas (20-22, 41) según la cual son las formas no mucoides las que tienden a colonizar los sustratos sólidos (en nuestro trabajo las que presentaron una mayor Adh_{max}) mientras que las formas mucoides garantizan la persistencia de las biocapas así formadas (en nuestra serie fueron precisamente las cepas mucoides las que presentaron cifras cercanas a la Adh_{max} durante mayor tiempo).

Los mecanismos y factores implicados en P.aeruginosa en la transformación mucoide-no mucoide y viceversa, sólo se conocen parcialmente, y han sido comentados en la introducción a este trabajo.

Se ha descubierto una enzima periplásmica, la poliurónico-depolimerasa que degrada el "slime" en P.aeruginosa (103); es posible que su actividad sea la que permita la aparición de variantes no mucoides a partir de las mucoides, pero de todos modos su mecanismo de puesta en marcha no ha sido esclarecido aún. Asimismo hemos de tener en cuenta que la producción de "slime" no es exclusiva de las formas mucoides, también las no mucoides pueden sintetizarlo, aunque en cantidades mucho más bajas (29). Parece probable pensar que el conocimiento de la regulación de la síntesis de "slime" permitirá avanzar en la lucha frente a P.aeruginosa e incluso frente a otros microorganismos (S.epidermidis, otros bacilos gramnegativos...), cuya adherencia a biopolímeros también está mediada por sustancias en mayor o menor grado similares al "slime" de P.aeruginosa.

En estudios morfológicos previos, se ha observado

que los microorganismos adheridos a la superficie de un biomaterial se encuentran inmersos en una capa de "slime", y que este es un factor clave en la protección de las biocapas frente a diferentes agentes adversos (31-38).

Al estudiar la adherencia a PVC-1 y LS con microscopía electrónica de barrido hemos podido comprobar que en tiempos sucesivos aparecen mayor número de células adheridas al biomaterial y que a partir de la primera hora, y sobre todo tras 4 horas, los microorganismos ya están recubiertos por una capa de "slime".

En la interacción con PUT y PVC-2 también observamos claramente un aumento considerable del número de microorganismos adheridos a lo largo del tiempo. Si observamos las fotografías de MEB (Fig. 13) podremos comprobar la existencia de puentes de conexión entre las bacterias; presumiblemente se trata de puentes de "slime" cuya estructura se ha deformado como consecuencia de las sucesivas deshidrataciones que deben realizarse para la observación microscópica, este fenómeno es bien conocido por trabajos realizados previamente por otros investigadores, específicamente dirigidos al estudio con MEB de la estructura del "slime", y en los que se ha podido observar que dicha estructura sólo se mantiene mediante su estabilización previa con lectinas o anticuerpos (22, 25).

Hemos de observar también que la cepa empleada en el estudio con MEB (cepa 2) era una cepa no mucoide, de acuerdo con los criterios clásicos de denominación de las colonias de P.aeruginosa; en el estudio realizado, coincidente con otros de la literatura (29, 42, 62, 71, 82), se observa que esta cepa produce "slime" cuando se adhiere a superficies sólidas; con ello volvemos a

poner en entredicho la utilidad del método modificado de Christensen para la evaluación de "slime" en P.aeruginosa y coincidimos con Anastassiou y cols. (29) en señalar que la producción de "slime" no es un factor exclusivo de las cepas cuyas colonias poseen aspecto mucóide en medios sólidos habituales.

Las cifras de adherencia inicial (5 minutos), para una misma cepa presentaron valores similares al considerar los distintos biomateriales.

Sí hemos observado diferencias en otros parámetros al considerar las cepas no mucoides, frente a cada uno de los biomateriales; estos parámetros son los referidos al valor de la adherencia máxima, el tiempo tras el cual se alcanza dicho valor, y el número final de bacterias adheridas a los 7 días. Las cifras de Adh_{max} a PVC-1 y LS fueron superiores a las obtenidas en PVC-2 y PUT (Tabla 9). Los valores máximos se alcanzaron con PVC-1 a los 2-3 días, con LS a los 1-2 días y con PUT y PVC-2 aparecieron en tan sólo 1-4 horas (Figuras 9 y 10). En nuestra opinión estos datos justifican la necesidad de estudiar la adherencia bacteriana a nuevos biomateriales antes de comenzar a usarlos en la fabricación de dispositivos de uso médico.

En cepas mucoides las diferencias determinadas por el biomaterial han sido menos marcadas que en las cepas no mucoides. De hecho en la cepa 9 y en menor medida en las cepas 7 y 8, los resultados obtenidos indican un comportamiento muy similar en la interacción con los distintos biomateriales, lo que sugiere que son las diferencias propias de las tres cepas mucoides, más que las propiedades características de cada biomaterial, las que determinan las diferencias observadas.



Pasaremos ahora a analizar los resultados obtenidos sobre la adherencia de P.aeruginosa (cepa 2) crecida en presencia de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos. Queremos aclarar, antes de entrar a discutir los resultados en cuestión, que estos han sido como tanto por mil de radiactividad adherida y no como UFC/cm² adheridas. Hemos de tener en cuenta que la preincubación con antimicrobianos puede afectar la morfología, la estructura y la fisiología bacteriana (43) determinando la formación de filamentos o agregados bacterianos que en el recuento con las técnicas habituales (dilución seriada y expresión de UFC) pueden llevar a resultados engañosos, menores muy probablemente de los que se obtendrían al considerar la masa bacteriana total. (73).

La adherencia de la cepa estudiada, tratada con concentraciones subinhibitorias de amicacina, ceftazidima y ciprofloxacina se afectó en alguna fase del período de estudio (1 hora a 3 días) cuando se trataba de PVC-1 y de LS, lo hizo parcialmente cuando se trataba de PVC-2 (ciprofloxacina y ceftazidima en las fases iniciales) y no se afectó en el caso de PUT; las bajas cifras de adherencia a estos dos últimos biomateriales, junto con la menor capacidad de supervivencia de P.aeruginosa en presencia de los mismos podrían explicar, al menos parcialmente, este comportamiento.

Por otra parte, las diferencias más interesantes a nuestro juicio, derivan de la capacidad de cada uno de los tres antimicrobianos para inhibir la adherencia a PVC-1 y LS tras la primera hora. Mientras que amicacina no produjo inhibición, cefatizidima y ciprofloxacina sí lo hicieron: ceftazidima hasta las 4 horas y ciprofloxacina hasta los 3 días (último tiempo estudiado).

Aunque aún no se habían realizado estudios sobre el efecto de concentraciones subinhibitorias en la adherencia de P.aeruginosa a biopolímeros, sí se habían analizado en la interacción con superficies celulares. En estos trabajos (104, 105, Suárez y cols. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 1988, aceptado y pendiente de publicación) se ha observado que en cepas mucoides ceftazidima produce una disminución de la adherencia a células del tracto respiratorio; con tobramicina los resultados en este mismo tipo de células han sido contradictorios; la acción de estos antimicrobianos sobre cepas no mucoides han sido, en la experiencia de estos autores, heterogénea, con variaciones propias de la cepa considerada. Igualmente en cepas no mucoides, concentraciones subinhibitorias de ceftazidima, amicacina, imipenema, ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina, disminuyen significativamente la adherencia a una línea celular continua de origen nasofaríngeo (Kb). Los mismos trabajos indican que las cepas mucoides estudiadas en esas condiciones producen menos polisacárido, probablemente por favorecer la liberación de la poliurónico-depolimerasa, que degrada el "slime". Este hecho podría explicar al menos en parte, los efectos que nosotros hemos comprobado con ceftazidima y ciprofloxacina, pero en nuestra opinión son necesarios trabajos específicamente dirigidos al estudio de las interacciones de P.aeruginosa con superficies inertes para lograr comprender el mecanismo intrínseco de las mismas, y en qué medida se afecta este por los antimicrobianos.

Hemos de señalar también que los resultados de la inhibición de adherencia a los biopolímeros en estudio mediada por amicacina, ceftazidima y ciprofloxacina son superponibles a los que antes se apreciaron con poliestireno.

Algunos estudios previos (63, 72) indican que los estafilococos coagulasa negativa pueden aprovechar constituyentes de los catéteres para asegurar su viabilidad. Nosotros hemos comprobado en este estudio que los materiales empleados en la fabricación de catéteres pueden favorecer la viabilidad y el crecimiento de P.aeruginosa.

La primera fase del estudio se realizó subcultivando en tiempos sucesivos alícuotas de la fase líquida donde se realizó el experimento de adherencia de las nueve cepas de P.aeruginosa a los segmentos de catéter, tomando como control una suspensión que no contenía biomateriales, y observando el número de bacterias viables en cada caso. La inclusión de fragmentos de PVC-1 y de LS en la suspensión de P.aeruginosa en PBS determinó unas cifras de supervivencia significativamente superiores a las obtenidas en un control sin catéteres (Figura 18). Estas diferencias no se han observado cuando los biomateriales considerados fueron PUT y PVC-2.

Hemos comprobado que la acción de PVC-1 y LS, favoreciendo la supervivencia y multiplicación de P.aeruginosa, tiene lugar tanto con cepas no mucoides como con cepas mucoides. Con PVC-1 y tratándose de cepas no mucoides las diferencias en el número de UFC viables en la suspensión respecto al control sin catéteres fueron significativas a partir del primer día; estas diferencias se hicieron cada vez mayores durante los 10 días de estudio. En el caso de LS las diferencias observadas alcanzaron su máximo hacia el quinto día, tras ese momento el número de P.aeruginosa viables decreció ligeramente, aunque aún a los 10 días las diferencias seguían siendo significativamente superiores respecto a la suspensión sin segmentos de biomaterial.

En cepas mucoides hemos observado una disminución progresiva en el número de variantes mucoides (Figura 19) y un aumento en el de variantes no mucoides. Estas variaciones tuvieron lugar en presencia de PVC-1 y LS, pero no con PVC-2 y PUT (Figura 20); esta reversión mucoides-no mucoides es precisamente la observada en el crecimiento de cepas mucoides en un medio líquido en reposo, y por tanto es un índice indirecto de la multiplicación de estas cepas en la fase líquida.

Puesto que las diferencias observadas aun siendo significativas en el anterior modelo de estudio no eran especialmente marcadas (inferiores a un logaritmo), muy probablemente debido al alto inóculo inicial (10^8 UFC/ml), se realizó en una segunda fase un estudio similar pero partiendo de un inóculo mucho menor (10 UFC/ml) y centrando el trabajo, ya, con los dos biomateriales (PVC-1 y LS) en los que observamos diferencias de interés en la primera fase.

El estudio se llevó a cabo con la cepa 2. La mayor capacidad de crecimiento en el sobrenadante donde se habían mantenido segmentos de PVC-1 y LS que en PBS indica que dichos biomateriales sufren una degradación a consecuencia de la cual algunos de sus constituyentes son liberados al medio y pueden servir como sustratos nutritivos para esta cepa; ya se sabía por otros estudios que algunos catéteres intravasculares (106) sufren una degradación que permite la liberación de componentes con acción tóxica; nuestro estudio demuestra, además, que esos componentes pueden ser aprovechados por los microorganismos para su multiplicación; este hecho también podría ser la base de la supervivencia de estafilococos coagulasa negativos adheridos a biomateriales como ya había sido sugerido previamente (63, 72).

Podemos suponer, además, que las bacterias adheridas al biomaterial, al ser capaces de utilizar los constituyentes que tienden a pasar al medio logran asegurar su viabilidad; ello explicaría las diferencias en las cifras de bacterias que se mantienen adheridas a los biomateriales estudiados, diferencias que al menos en parte deben estar marcadas por la capacidad de cada cepa para asimilar esos nutrientes y, también, por la facilidad con las que los diferentes biomateriales se degradan en un medio líquido. Como hemos observado ya, las cifras de supervivencia de las bacterias de la fase líquida son máximas con PVC-1 y LS, precisamente los dos biomateriales en los que se han obtenido las mayores cifras de adherencia en cepas no mucoides (tanto máxima como a los 7 días) (Tablas 6, 7, 8).

También son de interés las diferencias que hemos comprobado con PVC-1 y PVC-2: las cifras de adherencia a PVC-1 han sido mucho mayores que a PVC-2, y la supervivencia de P.aeruginosa en suspensión en presencia de este último fue similar a la de un control sin biomaterial (Figura 18).

Hemos de pensar, pues, que la proporción de aditivos añadidos en cada caso, como antes señalamos, es absolutamente diferente. Estudios previos (106) indican que las sustancias añadidas al PVC son plastificantes que disminuyen la rigidez del material; deberían tenerse en cuenta estos datos y los aportados por otros autores (63, 72) para reconsiderar la utilización de estos aditivos en la fabricación de dispositivos de uso médico.

La reciente aparición de otros biomateriales difícilmente degradables (especialmente los poliuretanos) podrían venir a solucionar estos inconvenientes;

de hecho el catéter de poliuretano que hemos empleado en nuestro estudio ha tenido un mejor comportamiento desde el punto de vista microbiológico que los fabricados con los otros biomateriales: la adherencia de P.aeruginosa a este biomaterial fue menor que a PVC-1 y LS y la viabilidad de P.aeruginosa en suspensión en presencia de fragmentos de catéter de PUT no fue significativamente mayor que la de un control sin biomaterial.

CONCLUSIONES

1. No hemos observado relación de determinados biotipos de P.aeruginosa con los valores de hidrofobicidad de superficie (HS), con la capacidad de producción de "slime" ni con la adherencia a biomateriales.
2. Los valores de HS en las nueve cepas de P.aeruginosa estudiadas mostraron un amplio rango de variabilidad, sin observar cepas marcadamente hidrófobas.
3. Los valores de HS no varían significativamente en cepas crecidas estacionariamente o en agitación. La adición de sulfato amónico a la fase acuosa de un sistema agua/p-xileno para determinar la HS no varía significativamente los valores de la misma.
4. La preincubación bacteriana en presencia de 1/4 x CMI de amicacina, ceftazidima, imipenema, cipro-

floxacina, norfloxacina y ofloxacina no afecta significativamente la expresión de la HS en P.aeruginosa.

5. Los estudios con microscopía electrónica indican que la producción de "slime" puede ocurrir también en cepas no mucoides. El método modificado de Christensen y cols. para la detección de "slime" en Staphylococcus no es adecuado para su aplicación en P.aeruginosa.
6. Existe una relación significativa entre la HS de P.aeruginosa y la adherencia inicial (≤ 4 horas) a poliestireno. La preincubación bacteriana en suero disminuye la HS de P.aeruginosa y su capacidad de adherencia a este polímero.
7. Las cifras de adherencia de cepas no mucoides de P.aeruginosa a cloruro de polivinilo con flexibilizantes (PVC-1) y sin ellos (PVC-2), a poliuretano (PUT) y a látex siliconizado (LS) aumentaron progresivamente en el tiempo hasta alcanzar un valor máximo variable para cada biomaterial, tras el que se produjo una disminución paulatina hasta el final del período de estudio (7 días).
8. En las cepas no mucoides de P.aeruginosa observamos una correlación significativa entre HS y la adherencia inicial (≤ 5 minutos) a los cuatro biomateriales estudiados. Esta correlación se mantuvo hasta 1 hora sólo en el caso de PVC-1 y desapareció para todos los biomateriales tras 8 horas.
9. Las cifras de adherencia máxima de las cepas no mucoides fueron mayores para PVC-1, siendo menores progresivamente para LS, PUT y PVC-2.

10. Para las cepas no mucoides de P.aeruginosa el tiempo transcurrido hasta alcanzar el valor máximo de adherencia fue de 1 a 4 horas para PUT y PVC-2, de 1 hora a 2 días para LS y de 2 a 3 días para PVC-1.
11. En cepas no mucoides las cifras de bacterias adheridas tras siete días de interacción con los biomateriales estudiados fueron mayores para PVC-1 y LS y menores para PUT y PVC-2.
12. Las cifras de adherencia de las cepas no mucoides fueron mayores que las de cepas mucoides durante el período de estudio, exceptuando las cifras finales (7 días) de adherencia a PVC-2, similares en ambos tipos de cepas, y a PUT donde fueron mayores en cepas mucoides.
13. La variante no mucoide obtenida en el laboratorio a partir de una cepa mucoide tiene una cinética de adherencia similar al del resto de cepas no mucoides y diferente al de la cepa mucoide original.
14. El crecimiento bacteriano en presencia de concentraciones $1/4$ x CMI de amicacina, no inhibe la adherencia a ninguno de los cuatro biomateriales estudiados. En iguales condiciones ceftazidima inhibe la adherencia a PVC-1 y LS y PVC-2 hasta las 4 horas. Ciprofloxacina inhibió la adherencia a PVC-1, LS hasta al menos los 3 días de interacción, y a PVC-2 hasta el primer día.
15. El sobrenadante del PBS conteniendo segmentos de PVC-1 y LS permite un mayor crecimiento de las cepas de P.aeruginosa que el de un control sin biomateriales o con PUT o PVC-2.

16. Creemos conveniente incluir el estudio de la interacción microorganismo-biomaterial en la evaluación de nuevos biomateriales de aplicación clínica.

BIBLIOGRAFIA

1. Gessard C. Sur les colorations bleue et verte des linges à pansements. C R Sceances Acad Sci Serie D 1882, 94: 536-538.
2. Stanley MM: Bacillus pyoceaneus infections: a review of cases, and discussion of newer therapy including streptomycin. Am J Med 1947, 2: 253-277.
3. Young LS: The clinical challenge of infections due to Pseudomonas aeruginosa. Rev Infect Dis 1984, 6 (Suppl. 3): S603-S607.
4. Hancock REW: Intrinsic resistance of Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother 1986, 18: 653-656.
5. Baltch AL, Griffin PE: Pseudomonas aeruginosa bacteriemia: a clinical study of 75 patients. Am J Med Sci 1977, 274: 119-129.

6. Palleroni NJ. Genus I: Pseudomonas. En: Krieg N R, Holt J G (eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1. 1^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1984, pp: 141-149.
7. Gilardi GL: Pseudomonas. En: Lennette E H (ed): Manual of Clinical Microbiology. 4^a ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985, pp: 350-372.
8. Bergan T: Human and animal pathogenic members of the genus Pseudomonas. En: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG: The prokaryotes. Volume I. Berlin: Springer-Verlag 1981, pp: 666-700.
9. Doggett RG: Incidence of mucoid Pseudomonas aeruginosa from clinical sources. Appl Microbiol 1969, 18: 936-937.
10. Rivera M, Nicotra, MB: Pseudomonas aeruginosa mucoid strains. Its significance in adult chest diseases. Am Rev Respir Dis 1982, 16: 833-836.
11. Stevens D, Lieberman M, McNitt T, Price J: Demonstration of uronic acid capsular material in the cerebrospinal fluid of a patient with meningitis caused by mucoid Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 1984, 19: 342-343.
12. Morrison AJ Jr, Wenzel R P: Epidemiology of infections due to Pseudomonas aeruginosa. Rev Infect Dis 1984, 6 (Suppl. 3): S627-S642.
13. Rhame FS: The ecology and epidemiology of Pseudomonas aeruginosa. En: Sabath LD (ed): Pseudomonas aeruginosa. Berne: Hans Huber 1979, pp: 31-51.

14. Young LS, Armstrong D: Human immunity to Pseudomonas aeruginosa. I. In vitro interaction of bacteria, polymorphonuclear leukocytes, and serum factors. J Infect Dis 1972, 126: 257-276.
15. Doi T, Yoshioka M, Nakajima T: Pseudomonas aeruginosa antibodies in human plasma. Japan J Exp Med 1976, 46: 149-154.
16. Peterson PK: Host defense against Pseudomonas aeruginosa. En: Doggett R G, Pseudomonas aeruginosa: Clinical manifestations of infection and current therapy. New York: Academic Press, 1979, pp: 103-118.
17. Bishop O, Orr T, Barrell PF: Phagocytosis and killing of Pseudomonas aeruginosa by mouse polymorphonuclear leukocytes in vitro promoted by antiserum to the slime glycoprotein. Infect Immun 1982, 37: 378-381.
18. Peterson PK, Kim Y, Schmeling D, Lindemann M, Verhoef J, Quie PG: Complement-mediated phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa. J Lab Clin Med 1978, 92: 883-894.
19. Speert DP, Loh BA, Cabral DA, Salit IE: Nonopsonic phagocytosis of non mucoid Pseudomonas aeruginosa by human neutrophils and monocyte-derived macrophages is correlated with bacterial piliation and hydrophobicity. Infect Immun 1986, 53: 207-212.
20. Costerton JW: The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: A hypothesis. Rev Infect Dis 1984, 6 (Suppl. 3): S608-S616.

21. Costerton JW: Pseudomonas aeruginosa in nature and disease. En: Sabath LD (ed): Pseudomonas aeruginosa. Berne: Hans Huber 1979, pp: 15-24.
22. Costerton JW, Brown MRW, Sturges JM: The cell envelope: its role in infection. En: Doggett RG (ed): Pseudomonas aeruginosa: clinical manifestations of infection and current therapy. New York, Academic Press, pp: 41-62.
23. Evans LR, Linker A: Production and characterization of the slime polysaccharide of Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 1973, 46: 915-923.
24. Pier GB, Matthews WJ, Eardly DD: Immunochemical characterization of the mucoid exopolysaccharide of Pseudomonas aeruginosa. J Infect Dis 1983, 147: 494-503.
25. Costerton JW, Irvin RT: The bacterial glycocalyx in nature and disease. Ann Rev Microbiol 1981, 35: 299-324.
26. Govan JRW, Fyfe JAM: Mucoid Pseudomonas aeruginosa and cystic fibrosis: resistance of the mucoid form to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of mucoid variants in vitro. J Antimicrob Chemother 1978, 4: 233-240.
27. Govan JRW: Mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa: the influence of culture medium on the stability of mucus production. J Med Microbiol 1975, 8: 513-522.
28. Govan JRW, Fyfe JAM, McMillan C: The instability of mucoid Pseudomonas aeruginosa: fluctuation test and improved stability of the mucoid form in

- shaken culture. J Gen Microbiol 1979, 110: 229-232.
29. Anastassiou ED, Mintzas AC, Kounavis C, Dimitracopoulos G: Alginate production by clinical non mucoid Pseudomonas aeruginosa strains. J Clin Microbiol 1987, 25: 656-659.
 30. Bartell PF, Orr TE, Chudio B: Purification and chemical composition of the protective slime antigen of Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 1970, 2: 543-548.
 31. Blackwood CL, Pennington JE: Influence of mucoid coating on clearance of Pseudomonas aeruginosa from lungs. Infect Immun 1981, 32: 443-448.
 32. Baltimore RS, Mitchell M: Immunologic investigations of mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa: comparison of susceptibility to opsonic antibody in mucoid and non-mucoid strains. J Infect Dis 1980, 141: 238-247.
 33. Marrie TJ, Harding GKM, Ronald AR, Dikkema J, Lam J, Hoban S, Costerton JW: Influence of mucoidy on antibody coating of Pseudomonas aeruginosa. J Infect Dis 1979, 139: 357-361.
 34. Schwarzmann S, Boring JR III: Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 1971, 3: 762-767.
 35. Laharrague PF, Corberand JX, Fillola G, Gleizes BJ, Fontanilles AM, Gyrard E: In vitro effect of the slime of Pseudomonas aeruginosa on the function of human polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun 1984, 44: 760-762.

36. Slack MPE, Nichols WW: The penetration of antibiotics through sodium alginate and through exopoly saccharide of a mucoid strain of Pseudomonas aeruginosa. Lancet 1981, 2: 502-503.
37. Baltimore RS, Cross AS, Dobeck AS: The inhibitory effect of sodium alginate on antibiotic activity against mucoid and non-mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother 1987, 20: 815-823.
38. Learn DB, Brestel EP, Seetharam S: Hypochlorite scavenging by Pseudomonas aeruginosa alginate. Infect Immun 1987, 55: 1813-1818.
39. Ramphal R, Pier GB: Role of Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. Infect Immun 1985, 47: 1-4.
40. Slusher MM, Myrvik QN, Lewis JC, Gristina AG: Extended-wear lenses, biofilm and bacterial adhesion. Arch Ophtalmol 1987, 105: 110-115.
41. Marrie TJ, Costerton JW: A scanning electron microscopic study of urine droppers and urine collecting systems. Arch Intern Med 1983, 143: 1135-1141.
42. Miller MJ, Ahearn AG: Adherence of Pseudomonas aeruginosa to hydrophilic contact lenses and other substrata. J Clin Microbiol 1987, 25: 1392-1397.
43. Beachey EH, Eisenstein BI, Ofek I: Bacterial adherence in infectious diseases. Current Concepts. The Upjohn Company. 1987.

44. Guyot G: Uber die bakterielle hämagglutination. Zentralbl Bakteriол. 1908, 47: 640-653.
45. Duguid JP, Smith IW, Dempster G, Edmuns PN: Non-flagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. J Pathol Bacteriol 1955, 70: 335-348.
46. Duguid JP, Gillies RR: Fimbriae and adhesive properties in dysentery bacilli. J Pathol Bacteriol 1957, 74: 397-411.
47. Duguid JP, Gillies RR: Fimbriae and haemagglutinating activity in *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus* and *Chromobacterium*. J Pathol Bacteriol 1958, 75: 519-520.
48. Gibbons RA, Jones GW, Sellwood R: An attempt to identify the intestinal receptor for the K88 adhesins by mean of a haemagglutination inhibition test using glycoproteins and fractions from sow colostrum. J Gen Microbiol 1975, 86: 228-240.
49. Fletcher M, Loeb GI: The influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. Appl Environ Microbiol 1979, 37: 67-72.
50. Christensen GD, Simpson WA, Beachey EH: Microbial adherence in infection. En: Mandell GL, Douglas RJ Jr, Bennett JE (eds): Principles and practice of infectious diseases. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons 1985, pp: 6-23.
51. Fattom A, Shilo M: Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. Appl Environ Microbiol 1984, 47: 135-143.

52. Magnusson KE: Hydrophobic interaction - a mechanism of bacterial binding. Scand J Infect Dis 1982, 33: 32-36.
53. Smith H: Microbial surfaces in relation to pathogenicity. Bacteriol Rev 1977, 41: 475-500.
54. Liungh A, Wadström T: Fimbriation in relation to hydrophobicity of bacteria in urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol 1984, 3: 568-570.
55. Falkowski W, Edwards M, Schaeffer AJ: Inhibitory effect of substituted aromatic hydrocarbons on adherence of Escherichia coli to human epithelial cells. Infect Immun 1986, 52: 863-866.
56. Stamm WE: Infections related to medical devices. Ann Intern Med 1978, 89 (part 2): 764-769.
57. Sanders RA, Sheldon GF: Septic complications of total parenteral nutrition. A five year experience. Am J Surg 1976, 132: 214-220.
58. Zdrahala RJ, Solomon DD, Lentz DJ, McGary CW Jr: Thermoplastic polyurethanes. Materials for vascular catheters. En: Planck H: Polyurethanes in biomedical engineering II. Amsterdam: Elsevier Science Publisher 1987, pp: 1-18.
59. De Haan RC: Toxicity of tissue culture media exposed to polyvinyl chloride plastic. Nature (New Biol) 1971, 231: 22-25.
60. Neegard J, Nielsen B, Faburby V: Plasticizers in PVC and the occurrence of hepatitis in a hemodialysis unit. Scand J Urol Nephrol 1971, 5: 141-146.

61. Ruutu M, Alfthan O, Talja M, Andersson LC: Cytotoxicity of latex urinary catheters. *Br J Urol* 1985, 57: 82-87.
62. Marrie TJ, Costerton JW: Scanning electron microscopic study of uropathogen adherence to a plastic surface. *Appl Environ Microbiol* 1983, 45: 1018-1124.
63. Peters G, Locci R, Pulverer G: Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 1982, 146: 479-482.
64. Locci R, Peters G, Pulverer G: Microbiol. colonization of prosthetic devices IV. Scanning electron microscopy of intravenous catheters invaded by yeasts. *Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene (B)* 1981, 173: 419-424.
65. Sugarman B: In vitro adherence of bacteria to prosthetic vascular grafts. *Infection* 1982, 10: 13-16.
66. Ashkenazi S, Mirelman D: Adherence of bacteria to pediatric intravenous catheters and needles and its relation to phlebitis in animals. *Ped Res* 1984, 18: 1361-1366.
67. Pascual A, Fleer A, Westardaal NAC, Verhoef J: Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters in vitro. *Eur J Clin Microbiol* 1986, 5: 518-522.
68. Sheth NK, Rose HD, Franson JF, Buckmire FLA, Sohnle PG: In vitro quantitative adherence of bacteria to intravascular catheters. *J Surg Res* 1983, 34: 213-217.

69. Gristina AG, Costerton JW: Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection. *Orthop Clin North Am* 1984, 15: 517-535.
70. Gristina AG, Oga M, Webb LX: Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science* 1985, 228: 990-993.
71. Duran JA, Refojo MF, Gipson IK, Kenyon KR: Pseudomonas attachment to new hydrogel contact lenses. *Arch Ophthalmol* 1987, 105: 106-109.
72. Franson TR, Sheth NK, Menon L, Sohnle PG: Persistent in vitro survival of coagulase-negative staphylococci adherent to intravascular catheters in the absence of conventional nutrients. *J Clin Microbiol* 1986, 24: 559-561.
73. Lorian V: Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, their virulence, and susceptibility to immunodefenses. En: Lorian V (ed): *Antibiotics in laboratory medicine*. 2^a ed. New York: Williams & Wilkins 1986: pp 596-668.
74. Ofek I, Beachey EH, Eisenstein BI, Alkan ML, Sharon N, Mirelman D: Suppression of bacterial adherence by sublethal concentration of B-lactam and aminoglycoside antibiotics. *Rev Infect Dis* 1979, 1: 832-837.
75. Sandberg T, Stenqvist K, Svanborg-Eden C: Effects of subminimal inhibitory concentrations of ampicillin, chloramphenicol and nitrofurantoin on the attachment of Escherichia coli to human epithelial cells in vitro. *Rev Infect Dis* 1979, 1: 838-844.

76. Chopra I, Hacker K: Inhibition of K-88-mediated adhesion of Escherichia coli to mammalian receptors by antibiotics that affect bacterial protein synthesis. J Antimicrob Chemother 1986, 16: 441-451.
77. Peros WJ, Gibbons RJ: Influence of sublethal antibiotic concentrations on bacterial adherence to saliva treated hydroxyapatite. Infect Immun 1982, 35: 326-334.
78. Eisenstein BI, Ofek I, Beachey EH: Loss of lectin-like activity in aberrant type 1 fimbriae of Escherichia coli. Infect Immun 1981, 31: 792-797.
79. Beachey EH, Eisenstein BI, Ofek I: Adherence of bacteria: Prevention of the adhesion of bacteria to mucosal surfaces: influence of antimicrobial agents. En: Eickenberg, Hahn, Opferkuch (eds): The influence of antibiotics on the host-parasit interactionship. Munich: Springer-Verlach 1982: pp 171-193.
80. Vosbeck K, Mandschin H, Menge EB: Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on adhesiveness of Escherichia coli in vitro. Rev Infect Dis 1979, 1: 845.
81. Evans RC, Holmes CJ: Effect of vancomycin hydrochloride on Staphylococcus epidermidis biofilm associated with silicone elastomer. Antimicrob Agents Chemother 1987, 31: 889-894.
82. Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW: Tobramycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on a urinary catheters material. Antimicrob Agents Chemother 1985, 25: 619-624.

83. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria than grow aerobically. Approved standard. NCCLS publication M7A. Villanova, PA. 1985.
84. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E: Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Letters 1980 , 9: 29-33.
85. Rosenberg M: Ammonium sulphate enhances adherence of Escherichia coli J5 to hydrocarbons and polystyrene. FEMS Microbiol Letters 1984, 25: 41-45.
86. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH: Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. Infect Immun 1982, 37: 318-326.
87. Wenzel RP: Surveillance. En: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE (eds): Principles and practice of infectious diseases, 2^a ed. New York: John Wiley & Sons 1985, pp: 1604-1608.
88. Pennington JE: Nosocomial respiratory infections. En: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE (eds): Principles and practice of infectious diseases, 2^a ed. New York: John Wiley & Sons 1985, pp: 1620-1625.
89. Wenzel RP, Thompson RC: Nosocomial urinary tract infection. En: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE (eds): Principles and practice of infectious diseases, 2^a ed. New York: John Wiley & Sons 1985, pp: 1625-1627.

90. Henderson DK: Bacteriemia due to percutaneous intravascular devices. En: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE (eds): Principles and practice of infectious diseases, 2^a ed. New York: John Wiley & Sons 1985, pp: 1612-1620.
91. Magnusson KE: The hydrophobic effect and how it can be measured with relevance to cell-cell interactions. Scand J Infect Dis. 1980, 24: 131-134.
92. Lindahl M, Faris A, Nadstrom T, Hjerten A: A new test based on salting-out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. Biochim Biophys Acta (Amst) 1981, 647: 471-476.
93. Smyth CJ, Johnson P, Olsson E, Söderlind O, Rosengren J, Hjertén S, Wadström T: Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic Escherichia coli with or without K 88 antigen as revealed by hydrophobic interactions chromatography. Infect Immun 1978, 22: 462-472.
94. Hazen KC, Plotkin BJ, Klimas DM: Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of Candida albicans and Candida glabrata. Infect Immun 1986, 54: 269-271.
95. Kabir S, Ali S: Characterization of surface properties of Vibrio cholerae. Infect Immun 1983, 39: 1048-1058.
96. Ferreirós CM, Criado MT, Sáinz V, Carballo J, Del Río C, Suárez B: Evaluation of hydrophobicity and adherence of Neisseria meningitidis strains and a study of their correlation by analysis of alterations induced by antibiotics. Ann Inst Pasteur (Microbiol) 1986, 137 B: 37-45.

97. Schadow KM, Simpson WA, Christensen GD: Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *J Infect Dis* 1988, 157: 71-77.
98. Klein V, Pawelzik M, Opferkuch W: Influence of β -lactam antibiotics, fosfomycin and vancomycin on the adherence (hemagglutination) of Escherichia coli containing different adhesins. *Chemotherapy* 1985, 31: 138-145.
99. Peters G, Schumacher-Perdreau F, Jansen B, Bey M, Pulverer G: Biology of Staphylococcus epidermidis extracellular slime. En: Pulverer G, Quie PG, Peters G: Pathogenicity and clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Stuttgart: G. Fischer Verlag 1987, pp: 15-31.
100. Hogt AH, Dankert J, de Vries JA, Feijen J: Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *J Gen Microbiol* 1983, 129: 2959-2968.
101. Rotrosen D, Gibson TR, Edwards JE Jr: Adherence of Candida species to intravenous catheters. *J Infect Dis* 1983, 147: 594.
102. Fleer A, Verhoef J, Pascual Hernández A: Coagulase negative staphylococci as nosocomial pathogens in neonates. *Am J Med* 1986, 80 (suppl. 6B): S161-S165.
103. Dunne WM Jr, Buckmire FLA: Partial purification and characterization of a polymannuronic acid depolymerase produced by a mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from a cystic fibrosis patients. *Appl Environ Microbiol* 1985, 50: 562-567.

104. Virshwanath S, Guay CM, Ramphal R: Effects of sub-minimal inhibitory concentrations of antibiotics on the adherence of Pseudomonas aeruginosa to tracheobronchial mucin. J Antimicrob Chemother 1987, 19: 579-583.
105. Geers T, Baker NR: The effect of sublethal levels of antibiotics on the pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa to tracheal tissue. J Antimicrob Chemother 1987, 19: 569-578.
106. Burric, Ahnefeld FW: Cava katheter. Berlin: Springer-Verlag, 1981.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. LUIS MARTINEZ MARTINEZ

titulada Tratamiento de adeno-carcinoma de Pseudo-papilas
Bucal, a través de los estirios de un
médico

acordó otorgarle la calificación de APTO CON LAUDE

Sevilla, 3 de Noviembre 1988

El Vocál,
[Signature]
El Presidente

El Vocál,
[Signature]
El Secretario,
[Signature]

El Vocál,
[Signature]
El Doctorado,
[Signature]