

R. 15109
O.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 212 número 27 del libro
correspondiente.

Sevilla, _____

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alonso Lafite



EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE
ANTIMICROBIANOS SOBRE LA ADHERENCIA BACTERIANA

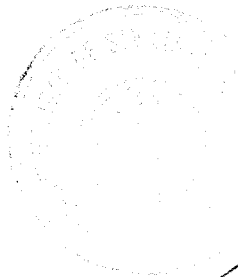
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en Departamento de Metabolismo
de la Facultad
de esta Universidad desde el día
hasta el día

Sevilla 20 de Septiembre de 1988

EL DIRECTOR DEL Departamento

Antonio Tomás





UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CATEDRÁTICO 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^a ANA ISABEL SUAREZ BARRENECHEA, ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada "EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LA ADHERENCIA BACTERIANA".

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

Fdo.: Prof. E.J. Perea

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Evelio J. Perea Pérez por su inestimable dirección y apoyo para la realización de este estudio.

Al Dr. Alvaro Pascual Hernández por sus constantes aportaciones sin las cuales gran parte de este trabajo no hubiese sido posible.

A la Dra. Milagrosa Díaz Gálvez y a su equipo del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario de Sevilla.

A Mercedes Lomas Campos por sus consejos en la base de elaboración de datos.

A todas las personas que constituyen el grupo de trabajo en Adherencia y Fagocitosis.

A Luis M. Suárez Barrenechea, por el trabajo gráfico.

A Matilde Monge Troya por su colaboración al mecanografiar este texto.

A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología.

A aquellas personas que quedaron en segundo plano.

Gracias.

INDICE

	<u>Pág</u>
INTRODUCCION	2
MATERIAL	14
METODOS	20
RESULTADOS	34
DISCUSION	85
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFIA	111

INTRODUCCION

Desde el primer aislamiento en el laboratorio de P.aeruginosa procedente de una herida quirúrgica en 1882 (1), las infecciones nosocomiales producidas por este microorganismo se han incrementado, emergiendo en la actualidad como un importante patógeno oportunista a nivel hospitalario.

La introducción de antibióticos de amplio espectro en la terapéutica, así como el aumento del número de pacientes especialmente susceptibles a las infecciones por P.aeruginosa como neutropénicos, enfermos con procesos malignos, fibrosis quística, grandes quemados y heridas traumáticas, constituyen factores importantes en la prevalencia de estas infecciones. Además P.aeruginosa posee una singular ecología. En primer lugar tiene mínimos requerimientos nutricionales, siendo capaz de sobrevivir en una amplia variedad de condiciones físicas, no necesita factores de crecimiento, puede utilizar como única fuente de

carbono el dióxido de carbono y tolera altas concentraciones de sales; aunque no sobrevive a la desecación, puede multiplicarse en ambientes húmedos, creciendo en un rango de temperatura de 20-42° C. En segundo término P.aeruginosa tiene una amplia resistencia a desinfectantes y antimicrobianos, determinada por la adaptación evolutiva a su hábitat natural donde una gran variedad de microorganismos producen sustancias bactericidas. En último lugar la producción de sustancias como las bacteriocinas favorecen su implantación al competir con bacterias comensales de la misma o distinta especie (2).

Por todo ello, P.aeruginosa se constituye como el primer patógeno responsable de las neumonías nosocomiales (3), el segundo en infecciones de heridas que inciden en grandes quemados e infecciones del tracto urinario hospitalarias (4) y el tercer patógeno en frecuencia aislado en bacteriemias por microorganismos Gram negativos (5), las cuales se encuentran asociadas con la mayor mortalidad (2).

En los últimos años se han acumulado una serie de evidencias sugiriendo que la fase inicial en la patogénesis de las enfermedades infecciosas es la colonización de las células susceptibles de ser infectadas. Para ello es necesario que se produzca la adherencia de los microorganismos a células de las superficies mucosas (6).

La adherencia bacteriana a células epiteliales supone una ventaja para la supervivencia del patógeno frente a los mecanismos de defensa del huésped, por un lado mediante esta unión se impide su eliminación por las secreciones mucosas o por la orina, siendo en algunos casos un requisito imprescindible para la eficaz liberación de toxinas. Pero también ofrece des-

ventajas para la bacteria, así su unión a leucocitos polimorfonucleares las hace más susceptible a la fagocitosis (7,8).

El fenómeno de la adherencia se establece en dos fases: inicialmente mediante unos mecanismos inespecíficos, bacteria y célula huésped interaccionan entre sí, adhesión, produciéndose posteriormente un mecanismo específico que constituye el fenómeno más importante, la adherencia.

La adhesión de las bacterias a las células huésped es directamente proporcional al grado de colisión de los microorganismos con las células producido por el azar y a su vez, este choque es proporcional a la concentración existente de cada tipo de células (9).

A continuación entran en juego los mecanismos inespecíficos de adherencia que van a tener como finalidad la formación de múltiples uniones entre bacteria y célula huésped. Las células de los mamíferos se encuentran cargadas con un potencial de superficie de carácter negativo, debido principalmente a la ionización de los residuos de ácido siálico del glicocalix y adicionalmente juegan un papel importante cadenas laterales de aminoácidos básicos y ácidos, glicolípidos y aminofosfolípidos. Estos grupos de carga atraen iones de signo opuesto del medio que les rodea, creando en conjunto una carga eléctrica doble, que a fines prácticos es parte de la superficie celular.

Por su parte las bacterias se encuentran también cargadas negativamente. En esta situación la teoría coloidal de DERJAGUIN y LANDAU (10) y VERWEY y OVERBEEK (11), ha hecho posible que sepamos en parte como se produce la adherencia entre células de igual carga, de forma teórica. Por un lado existen una serie de fuerzas

débiles inespecíficas de largo alcance como gravitación, quimiotaxis, atracción London-van Der Waals que consiguen atraer el microorganismo a la superficie celular y por otro lado fuerzas de corto alcance como repulsión London-van Der Waals y otros impedimentos, los repelen. Estas fuerzas de atracción-repulsión se equilibran, situando las bacterias en un espacio llamado mínimo secundario, que se encuentra aún espacialmente lejos de la superficie celular. La concentración de partículas en este lugar se denomina adsorción, adquiriendo un carácter reversible. Si los microorganismos vencen las fuerzas de repulsión, se consigue la unión mediante unas fuerzas de atracción fuertes pero de corto alcance, como uniones covalentes, de hidrógeno, iónicas e hidrofóbicas. Estas crean una situación irreversible, constituyendo el mínimo primario.

La barrera de energía que separa ambos mínimos puede ser vencida de varias formas. Muchos microorganismos excretan o sintetizan unos componentes poliméricos extracelulares, como slime; esta sustancia queda absorbida al sustrato y con ella, el microorganismo. También en un medio acuoso, como las mucosas, la hidrofobicidad de superficie microbiana promueve la asociación a regiones liofílicas de las membranas encariotas, evitando de esta manera la fase acuosa. La finalidad de la interacción hidrofóbica es la reducción de la energía libre del sistema, ya que el estado de las partículas separadas rodeadas de agua requiere mayor gasto energético que cuando se encuentran unidas (12).

La expresión de la hidrofobicidad de superficie por los microorganismos se encuentra influenciada por la etapa de crecimiento, respuesta al ambiente, influencias genéticas y por la alteración de las

estructuras adhesivas. Diversos autores han demostrado que la carga negativa y la hidrofobicidad de superficie promueven la unión de distintos microorganismos a células de mamíferos (13) y se ha sugerido que la hidrofobicidad prepara el terreno a futuras uniones, al situar las dos superficies en un espacio reducido, estabilizando su yuxtaposición hasta que las interacciones específicas entre moléculas complementarias tenga lugar.

Los mecanismos específicos producen el anclaje permanente de las bacterias a la superficie celular, para lo cual se requiere la formación de múltiples uniones entre dos estructuras complementarias: adhesina y receptor. Las adhesinas son estructuras adhesivas que se encuentran en la superficie de los microorganismos, mientras que los receptores son estructuras complementarias de la superficie de la célula huésped.

En general las adhesinas se asocian con fimbrias de superficie y pilis en bacterias Gram negativas y fibrillas de superficie en las Gram positivas. Los receptores celulares generalmente están constituidos por compuestos de hidratos de carbono, glucolípidos o glucoproteínas, aunque también se ha descrito un receptor protéico, la fibronectina (14).

Ambas estructuras deben ser accesibles y su disposición espacial será la idónea para que tenga lugar la formación de múltiples uniones en las proximidades del área de contacto. De esta manera las interacciones formadas bajo condiciones fisiológicas comienzan a ser virtualmente irreversibles, ya que aunque cada unión es por sí misma muy débil, la probabilidad de que todas ellas se rompan al mismo tiempo es muy pequeña (9).

La adherencia y las estructuras implicadas en

ella, han sido objeto de numerosos estudios en Escherichia coli, Streptococcus pyogenes, Neisseria gonorrhoeae,...

Las adhesinas de P.aeruginosa implicadas en el fenómeno de adherencia a células epiteliales de mamíferos, son diferentes según estudiemos cepas mucosas o cepas no mucosas.

Las cepas mucoides han sido estudiadas extensamente debido a la producción de bronconeumonías en pacientes con fibrosis quística. En la fase inicial de esta enfermedad se produce una colonización oral con cepas de P.aeruginosa no mucoides, que actúan como reservorio para la infección pulmonar descendente; siendo en la evolución cuando se producen cambios fenotípicos que desencadenan la prevalencia de cepas mucoides, a su vez asociadas con infecciones de mayor gravedad (15). Este predominio de las variantes mucosas se encuentra en relación con su resistencia a la fagocitosis debido a la producción de cápsula (16) y su crecimiento en el foco de infección formando microcolonias. Otros factores implicados son la resistencia al surfactante pulmonar (17) y a los antimicrobianos (18). Y por último se encuentra en relación directa con su capacidad de unión al epitelio ciliado respiratorio (19).

Se ha demostrado que la adherencia de estas cepas está mediada por un exopolisacárido mucoide, el cual actúa como adhesina para las células epiteliales de la boca (20), células traqueales (21), y mucina traqueo-bronquial (22). Esta estructura es un polímero similar al alginato, compuesto por ácido D-manurónico y su epímero ácido 5'L-gulurónico, el cual se encuentra disperso dentro del polímero, produciendo secciones homogéneas y heterogéneas en la estructura primaria. El

ácido D-manurónico posee residuos O acetilados, pero el grado de acetilación así como el porcentaje de composición y el rango molar del ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico difiere según la cepa estudiada. Este compuesto aislado de distintas cepas es heterogéneo inmunológicamente y fácilmente se identifican distintos epitopos (23). Sin embargo en otros estudios realizados in vitro, los anticuerpos creados frente a este exopolisacárido son capaces de bloquear la adherencia tanto de cepas homólogas como heterólogas (21).

En las cepas no mucoides de P.aeruginosa, la adherencia se encuentra mediada por pilis, que actúan como mediador de la unión a células de la boca (24) y células traqueales (25,26). Los pilis son estructuras retráctiles de naturaleza protéica y polar, que contienen dominios altamente hidrofóbicos e intervienen en la adherencia a células epiteliales y eucariotas, ya sea por la interacción con receptores específicos o por la generación de una fuerza de atracción netamente hidrofóbica (27). También esta estructura realiza la adherencia a la mucina traqueobronquial (22); esta unión se realiza de forma rápida, alcanzando la saturación a los treinta minutos y existiendo una mayor afinidad de P.aeruginosa, cuando se compara con E.coli y Klebsiella pneumoniae (28). Esto explicaría la propensión de esta bacteria a colonizar secreciones traqueobronquiales retenidas que no podrían eliminar los microorganismos, favoreciéndose de esta manera su multiplicación y posterior infección.

Se ha comprobado que la adherencia de P.aeruginosa se realiza por su unión a los cilios de las células traqueales, siendo el eje mayor de la bacteria paralelo al de los cilios; por el contrario la unión es mínima al cuerpo o a células no ciliadas (29).

La adherencia a células de la boca queda inhibida de manera dosis dependiente al introducir en el sistema pilis, ya sean homólogos o heterólogos; sin embargo debido a la heterogeneidad de los pilis, los anticuerpos formados frente a éste, solo producen la inhibición de la unión de la cepa homóloga (25).

Los receptores tanto de las células del aparato respiratorio como de la mucina traqueobronquial para P.aeruginosa parecen estar constituidos por un hidrato de carbono, el ácido N-acetil-neuramínico (29, 30, 31). Este compuesto ha sido el único capaz de inhibir competitivamente la adherencia de este microorganismo (32, 33, 34), aunque existen evidencias de la existencia de diferencias sutiles entre receptores de las cepas mucoides y no mucoides, ya que la presencia de pilis en el sistema no inhibe la unión de cepas mucosas, ni la presencia de exopolisacárido es capaz de inhibir la adherencia de cepas no mucoides (22).

No es de extrañar la naturaleza química de este receptor ya que el ácido N-acetil-neuramínico es compartido como receptor por otros patógenos respiratorios como Micoplasma pneumoniae (35) y virus Influenza (36).

La prevención de la adherencia bacteriana a células epiteliales ha sido objeto de estudio para diversos autores. Se han descrito tres vías para lograr este objetivo. En primer lugar, administrar análogos de adhesinas y receptores que actuando por inhibición competitiva, interfirieran en la colonización; sin embargo tiene el inconveniente de que también producen un bloqueo de la unión a las células fagocíticas. En segundo lugar, el empleo de vacunas o inmunización pasiva frente a las adhesinas bacterianas; para ello es un requisito indispensable, conseguir el perfecto

aislamiento y purificación de la adhesina. En el caso de cepas mucoides de P.aeruginosa sería eficaz una vacuna que estimulara la formación de anticuerpos frente al exomucopolisacárido, ya que se ha demostrado que éstos inhiben "in vitro" la adherencia de las cepas homólogas y heterólogas (21,37). Por el contrario en las cepas no mucoides, la vacuna no sería válida porque los anticuerpos formados contra el pili solo son capaces de evitar la unión de cepas homólogas, debido a la heterogeneidad del mismo (25).

Finalmente se ha estudiado el tratamiento con antimicrobianos de los microorganismos y células receptoras. Habitualmente el efecto de los antimicrobianos se ha definido en términos de capacidad de inhibición del crecimiento (concentración mínima inhibitoria: CMI) o bactericida (concentración mínima bactericida: CMB). Sin embargo existen en la actualidad evidencias de que niveles inferiores a la CMI tienen efectos múltiples sobre los microorganismos como disminución de su virulencia (38) o mayor susceptibilidad a ser eliminado por las defensas del huésped (39,40,41,42). El efecto de las concentraciones subinhibitorias sobre la adherencia bacteriana ha sido estudiada especialmente en E.coli (43,44,45,46,47,48,49, - 50,51) y Streptococcus spp (52,53). Ante los resultados obtenidos se ha postulado que los antimicrobianos producen un efecto antiadhesivo por cuatro mecanismos:

1. Alteración morfológica de las bacterias con lo cual queda modificada su capacidad de aproximación a receptores situados en la superficie celular (54).
2. Promoción de la pérdida de adhesinas de la superficie bacteriana (55).

- 3 Inducción de la formación de adhesinas funcionalmente deficientes (56).
4. Supresión de la síntesis y secreción de adhesinas situadas en la superficie bacteriana (57).

Por otra parte algunos autores han obtenido una inhibición de la adherencia microbiana al preincubar los microorganismos con concentraciones subinhibitorias de distintos antimicrobianos, encontrando una correlación con alteraciones de la hidrofobicidad de superficie bacteriana (58,59,60).

La mayoría de trabajos han sido realizados mediante técnicas "in vitro", aunque existen evidencias de que concentraciones inferiores a los niveles de CMI o CMB, en algunos casos pueden ser efectivas en la profilaxis o tratamiento de las infecciones (61,62,63,64).

Ante todos estos datos nos planteamos la hipótesis de trabajo: "Efectos de las concentraciones de antimicrobianos sobre la adherencia bacteriana". Para la realización del mismo, se ha estudiado diversos aspectos de la adherencia in vitro de cepas no mucoides de P.aeruginosa a células epiteliales:

1. Determinación de la producción de sustancia mucóide, factor implicado como promotor de la adsorción en las primeras fases de la adherencia.
2. Determinación de la hidrofobicidad de superficie de las cepas, factor implicado en el fenómeno de adhesión.
3. Estudio de la influencia de seis antimicro-

bianos en la hidrofobicidad de superficie bacteriana, investigando además si el tiempo de tratamiento constituye un factor importante en la expresión de esta propiedad.

4. Estudio de la adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales de una línea celular continua, mediante un método de lectura visual, investigando la posible correlación entre adherencia y su modificación por la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de seis antimicrobianos. Además intentar establecer si existen diferencias en la adherencia de bacterias tratadas con antimicrobianos durante dos tiempos diferentes de incubación.

5. Estudio de la adherencia de P.aeruginosa a células de una línea celular continua, mediante un método de lectura radiométrico, investigando si la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de seis antimicrobianos, produce modificaciones en la adherencia de los microorganismos. Además comprobar si el pretratamiento de las células epiteliales con antimicrobianos produce algún tipo de modificación, que se traduzca en alteraciones de la adherencia bacteriana. Y finalmente, estudiar si la presencia de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos durante el tiempo de unión de P.aeruginosa y células epiteliales, altera la adherencia.

MATERIAL

CEPAS BACTERIANAS.

Se utilizaron 5 cepas de Pseudomonas aeruginosa, de un total de 34, procedentes de pacientes del Hospital Clínico de Sevilla, incluyendo una cepa patrón de sensibilidad conocida: P.aeruginosa ATCC 27853, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Para su posterior utilización se conservaron congeladas en leche descremada (Molico) al 10 % en agua destilada, a -20°C. En su recuperación se empleó agar tripticasa de soja.

CELULAS EPITELIALES.

Para todos los experimentos, se empleó una línea celular establecida, procedente de carcinoma epidermoide de nasofaringe humano (Kb), cedida por el Centro Nacional de Virología, Majadahonda.

MEDIOS DE CULTIVO.

Agar Mueller Hinton (Difco)

Infusión de carne 300 gr.
 Hidrolizado ácido de caseína 17.5 gr.
 Almidón 1.5 gr.
 Agar 17 gr.
 Agua destilada 1000 cc.

Caldo tripticasa de soja (Difco)

Digerido pancreático de caseína 17 gr.
 Digerido papaínico de semilla de soja. 3 gr.
 Glucosa 2.5 gr.
 Fosfato dipotásico 2.5 gr.
 Cloruro sódico 5 gr.
 Agua destilada 1000 cc.

Agar tripticasa de soja (Difco)

Se añade a los componentes del caldo tripticasa de soja:

Agar 15 gr.

MEDIO DE MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.

- Medio esencial mínimo Eagle con solución equilibrada de sales Earle sin l-glutamina (MEM) (Whittaker M.A. Bioproducts. USA.).
- Suero bovino fetal (Whittaker M.A. Bioproducts. USA.).
- L-glutamina (Whittaker M.A. Bioproducts. USA.).



- Solución tampon HEPES (Whittaker M.A. Bioproducts. USA.).
- Solución penicilina-estreptomicina: penicilina G potásica 5000 U/ml. y sulfato de estreptomicina 5000 ugr/ml. (Whittaker M.A. Bioproducts. USA.).

Para el mantenimiento de la línea celular, cada 100 ml. de MEM se suplementa con:

- Suero bovino fetal 5 ml.
- l.-glutamina 1 ml.
- Tampon HEPES 1 ml.
- Penicilina-estreptomicina 2 ml.

SOLUCION TAMPON.

Tampón fosfato salino (PBS) pH = 7.2.

- $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 144 mg.
- Cl Na 8500 mg.
- $\text{PO}_4\text{H Na}_2$ 795 mg.
- Agua destilada 1000 ml.

REACTIVOS-COMPUESTOS QUIMICOS.

Material radioactivo y líquido de centelleo.

- 2- H^3 adenina, de actividad específica 24 Ci/mmol. (Amersham, UK).
- Cumene (Aqua Luma Plus, Lumac /3M. Netherlands). Líquido de centelleo especial para soluciones acuosas que lleva incluido el solvente orgánico.

Tripsina-verseno: Solución equilibrada de sales sin calcio ni magnesio, con 200 mg. de Verseno y 500 mg. de tripsina "I/250" (Whittaker M.A. Bioproducts. USA.).

p-xileno (Merck).

Dodecil sulfato sódico (Sigma).

Colorantes:

- Azul de metileno en solución según Löffler al 20 % (Merck).
- Solución de safranina al 0.1 % (Merck).

ANTIMICROBIANOS.

En todos los casos se utilizó polvo valorado, que fué pesado en una balanza de precisión de acuerdo a su actividad específica.

Se emplearon solventes específicos para disolver el polvo seco y así obtener soluciones madres que fueron almacenadas a -70°C . en alicuotas.

Posteriormente se usaron diluyentes apropiados, para preparar las soluciones de trabajo (Tabla 1).

TABLA 1.

<u>Antibiótico</u>	<u>Casa suministradora</u>	<u>Solvente</u>	<u>Diluyente</u>
Amicacina (AMC)	Bristol.	Agua destilada	Agua destilada
Imipenema (IME)	MS&D	Agua destilada	Agua destilada
Ceftazidima (CZ)	Glaxo	CO ₃ Na ₂ en agua	Agua destilada
Ciprofloxacina (CP)	Bayer	Agua destilada	Agua destilada
Ofloxacina (OF)	Hoestch	NaOH 0.1 N	Agua destilada
Norfloxacina (NF)	MS&D	NaOH 0.01 N	Agua destilada

METODOS

IDENTIFICACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

Para la identificación de las cepas bacterianas, se utilizaron métodos estandard de identificación bioquímica (65), que incluyeron las siguientes pruebas:

- oxidasa
- hidrólisis de la gelatina
- arginina dihidrolasa
- OFF basal-glucosa
- crecimiento sobre el medio Salmonella-Shigella
- utilización del citrato
- hidrólisis de la urea
- reducción de nitratos

- indol
- producción de SH₂
- crecimiento a 42°C
- hidrólisis de la esculina
- lisina decarboxilasa
- fenilalanina deaminasa
- DNA-asa
- ONPG

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI).

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar Mueller Hinton (66) a 37 cepas de Pseudomonas aeruginosa incluyendo una cepa patrón de sensibilidad conocida: P.aeruginosa ATCC 27853.

Se preparan las placas de agar Mueller Hinton conteniendo concentraciones en base 2 de los distintos antimicrobianos, con un rango para amicacina, ceftazidima e imipenema de 0.25 - 64 mg/l y para las tres quinolonas de 0.003 - 8 mg/l.

Las placas se inoculan con 0.001 ml. (aproximadamente 10⁵ bacterias) mediante el replicador de Steers (67), comenzando por las placas que contienen la menor concentración de antimicrobiano. Como control del adecuado crecimiento de las cepas se emplean placas con medio de cultivo sin antimicrobiano al comienzo y final de cada serie de antimicrobiano. Además una porción de la suspensión bacteriana se pipetea en una placa de agar Mueller Hinton, extendiéndose en forma de aislamiento, para observar su pureza.

Todas las placas se incuban a 35°C durante 18 horas.

La concentración mínima inhibitoria se define como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un cultivo de 18 horas a 35° C, en el que hemos inoculado un número aproximado de 10⁵ bacterias/ml. y se expresa en mg/l.

DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE SUSTANCIA MUCOIDE.

Para la determinación de la producción de sustancia mucoide por las cepas de P.aeruginosa, se utilizó la técnica descrita para estafilococos coagulasa negativos por CHRISTENSEN y cols. (68) y posteriormente empleada con cepas de P.aeruginosa por MILLER y cols. (69).

Se inocula 2-3 colonias de la cepa a estudiar, por duplicado, en tubos de vidrio conteniendo 10 ml. de caldo tripticasa de soja. Se incuban durante 24 y 48 horas en reposo a 35° C. en estufa.

Posteriormente se aspira con pipeta el contenido de los tubos y se llenan con agua (10 ml.). Este proceso se repite tres veces.

Se dejan secar los tubos a temperatura ambiente y a continuación se fijan con calor y se tiñen con safranina al 0.5 % (p/v) en agua destilada. Tras un minuto aproximadamente, se vacían de nuevo.

La producción de sustancia mucoide se expresa como positiva o negativa, por la observación visual del grado de tinción de la pared del tubo.

Cada determinación se realizó tres veces en días

diferentes y para establecer comparaciones se incluyó como patrón una cepa de Staphylococcus epidermidis productora de sustancia mucoide.

DETERMINACION DE LA HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE BACTERIANA.

La hidrofobicidad de superficie bacteriana fue medida por la técnica de ROSENBERG y cols. (70), que consiste en cuantificar la afinidad de una suspensión bacteriana en un sistema bifásico agua-xileno.

Se inoculan 2-3 colonias de la cepa a estudiar en 2 tubos con caldo tripticasa de soja y se incuban a 35°C durante 4 y 18 horas respectivamente. Se lavan las bacterias tres veces en tampón fosfato salino pH = 7.2 y se resuspenden en 3 ml. del mismo tampón a una densidad óptica de 0.6 en un espectofotómetro Spectronic 50I (Bausch & Lomb. USA) a una longitud de onda de 520 manómetros, que corresponde aproximadamente a 10⁹ UFC/ml., comprobado por recuento de colonias.

Se añade 0.25 ml. de p-xileno (Merck) a los tubos conteniendo las suspensiones bacterianas y se agitan durante 60 segundos (Agitador Heidolph Reax 2000). Se deja sedimentar a temperatura ambiente durante 20 minutos, para que se produzca la separación de fases, midiéndose la absorbancia de la fase acuosa de PBS a 520 nm.

Las suspensiones bacterianas iniciales y previamente a la adición de xileno se utilizan para medir la absorbancia inicial.

Los datos se elaboran mediante la siguiente fórmula:

Porcentaje de hidrofobicidad.

$$= 1 - \frac{\text{absorbancia después de la separación de fases}}{\text{absorbancia inicial}} \times 100$$

Para evaluar la influencia de las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la hidrofobicidad de superficie bacteriana, la cepa a estudiar se inocula, por duplicado, en tubos con caldo trípticasa de soja adicionados con antimicrobianos a concentraciones equivalentes a 1/4, 1/8 y 1/16 de su CMI, junto con un control sin antibiótico. De la misma forma descrita anteriormente, una batería de tubos se incuba durante 4 horas y otra durante 18 horas a 35° C.

A continuación se realiza el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Todos los experimentos se realizaron como mínimo 2 veces en días diferentes.

ADHERENCIA A CELULAS EPITELIALES:

I. METODO VISUAL.

Se utilizó la técnica descrita por SAVOIA y cols. (71).

Células epiteliales.

Se empleó una línea celular continúa procedente de carcinoma epidermoide de nasofaringe humano (Kb).

Se preparan cultivos celulares en frascos Costar (Greiner Labortechnik. Germany). Una vez conseguido un cultivo formando una monocapa celular, se retira el medio de mantenimiento y se añade un ml. de solución tripsina-verseno, previamente calentada en baño a 35° C. Se inunda toda la superficie efectuando movimientos de lavado y se elimina. Se repite el mismo procedimiento dejando actuar esta sustancia aproximadamente un minuto. Se incuba el frasco a 35° C. hasta que las células se desprenden. Posteriormente utilizando una pipeta, las células se resuspenden en 8 ml. de medio esencial mínimo (MEM), realizándose unos 15-20 movimientos de aspiración-expulsión sobre las paredes del frasco, con el objeto de dispersar los agregados celulares. Se añade un volumen de MEM hasta completar 30 ml. y se realiza el recuento celular, utilizando una cámara hemocitométrica (Fuchs-Rosenthal. Superior. Germany).

Utilizando MEM, se ajusta la suspensión celular a una concentración de 10^5 células/ml. y se suplementa por cada 100 ml. con:

- suero bovino fetal 5 ml.
- l-glutamina 1 ml.
- tampón HEPES 1 ml.

A continuación en tubos conteniendo en su fondo cubreobjetos circulares de vidrio de 12 mm. de diámetro, se subcultiva 1 ml. de células Kb, incubándose durante 18 horas en estufa a 35° C., con lo cual se obtiene un cultivo aún no confluyente.

Previamente a la inoculación bacteriana, se realizan 2 lavados con tampón fosfato salino pH = 7.2 de la superficie celular.

Bacterias.

Se inoculan 2-3 colonias, por duplicado, en tubos con 5 ml. de caldo tríplicasa de soja a los que se adiciona, tras crecimiento a 35° C. durante 2 horas, cada antimicrobiano a una concentración correspondiente a 1/4, 1/8 y 1/16 de la CMI de cada cepa, como control se deja un tubo sin antimicrobiano. Se incuban en estufa a 35° C. durante 4 horas. Se realiza el mismo procedimiento con una batería de tubos que se mantienen 18 horas en incubación.

Se efectúan tres lavados de las bacterias con tampón fosfato salino pH = 7.2 y se resuspenden en el mismo tampón, ajustándose a una densidad óptica de 0.08 en un espectofotómetro Spectronic 501 (Bausch & Lomb. USA) a una longitud de onda de 520 nm, que corresponde aproximadamente a 5×10^7 UFC/ml., comprobado por recuento de colonias.

Técnica de adherencia.

En los viales conteniendo en su fondo las células epiteliales, se inocula 1 ml. de bacterias previamente tratadas con concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos, así como el control sin tratamiento antibiótico. También se incluyen 2 viales que solo se inoculan con 1 ml. de tampón fosfato salino pH = 7.2, como control de la integridad de las células epiteliales durante todo el proceso.

Los viales se incuban a 35° C. en agitación (120 rpm) durante 60 minutos. El proceso de adherencia bacteriana se interrumpe colocando los viales a 4° C. y realizando 3 lavados con tampón fosfato salino pH = 7.2 frío, para eliminar las bacterias que no se han unido a la superficie celular.

Para realizar el recuento de bacterias adheridas, se efectúa una fijación con alcohol metílico durante 10 minutos y posteriormente una tinción con una solución de azul de metileno al 20 %.

Se extraen los cubreobjetos de los viales y se procede a su montaje en portas, para leerlos mediante microscopia óptica con objetivo de inmersión (Microscopio óptico Nikon SE. Japan).

Los resultados se evaluaron como la media del número de bacterias adheridas por célula epitelial, para lo cual fueron contadas 40 células por experimento. Posteriormente para su mejor comparación en las tablas de resultados, se expresa el porcentaje de inhibición de la adherencia de bacterias con tratamiento antibiótico con respecto al control sin tratamiento antimicrobiano.

Los ensayos se realizaron como mínimo 2 veces en días diferentes, y por duplicado.

II. METODO RADIOMETRICO.

Se utilizó la técnica descrita por VOSBECK y cols. (45).

Células epiteliales.

Se realiza el mismo procedimiento que en el método visual, así se subcultiva 1 ml. de una concentración de células Kb de 3×10^5 células/ml. en placas Costar (cada pocillo: 2 cm², Greiner Labortechnik. Germany) de 24 pocillos, para así obtener un cultivo confluyente a las 20 horas.

Para evaluar la posible influencia de la preincubación de las células epiteliales con concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos, paralelamente se inoculan otros pocillos con la misma concentración de células Kb y se adiciona el antimicrobiano a estudiar a $1/4$ CMI.

La incubación de la placa se realiza en jarra Gas Pak System (BBL) con un sobre (Gas generating Kit, Oxoid) que proporciona una atmósfera con un 5-10 % CO_2 . Se incuba en estufa a $35^\circ C$. durante 20 horas.

Inmediatamente antes de su uso en la técnica de adherencia, la monocapa celular se lava 2 veces con tampón fosfato salino pH = 7.2.

Bacterias

Se inoculan 2-3 colonias, por duplicado, en tubos con 5 ml. de caldo trípticasa de soja, a los que se adiciona tras crecimiento a $35^\circ C$. durante 2 horas, cada antimicrobiano a una concentración correspondiente a $1/4$ de la CMI de cada cepa, junto con un tubo sin tratamiento antibiótico. El marcaje radioactivo de las bacterias se realiza añadiendo 10 μl . de 2- H^3 -adenina (de actividad específica 24 Ci/mmol) (42).

Se incuba en estufa a $35^\circ C$. con agitación durante 18 horas.

Se efectúan tres lavados de las bacterias con tampón fosfato salino pH = 7.2 y se resuspenden en el mismo tampón, ajustándose a una densidad óptica de 0.08 en un espectrofotómetro Spectronic 501 (Bausch & Lomb. USA) a una longitud de onda de 520 nm, que corresponde aproximadamente a 5×10^7 UFC/ml, comprobado por recuento de colonias.

Técnica de adherencia.

Para evaluar la influencia de las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos en tres situaciones distintas, realizamos en paralelo con la misma cepa bacteriana y el mismo antimicrobiano los siguientes experimentos:

Prueba 1. Para investigar si se produce una modificación en los receptores de superficie de las células epiteliales, mediadas por concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos, se inocula un ml. de la suspensión bacteriana sin tratamiento antimicrobiano en el pocillo que contiene la monocapa celular previamente expuesta durante 18 horas a 1/4 CMI del antibiótico a estudiar.

Prueba 2. Para investigar el papel de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la formación del pili de P.aeruginosa, se inocula en el pocillo conteniendo la monocapa celular un ml. de la suspensión bacteriana que había estado en contacto con el antimicrobiano (1/4 CMI).

Prueba 3. Para investigar el papel de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos durante el proceso de adherencia, se inocula en el pocillo conteniendo la monocapa celular un ml. de la suspensión bacteriana sin previo tratamiento antibiótico, adicionando además el antimicrobiano a estudiar en una concentración de 1/4 CMI.

Controles.

Se dejan 2 pocillos que sirven como controles, uno con un ml. de la suspensión bacteriana sin ningún tipo de tratamiento antimicrobiano y otro que

contiene únicamente un ml de tampón fosfato salino pH = 7.2. El primero establece el punto de comparación para todos los ensayos en los que se ha introducido un tratamiento antimicrobiano y el segundo permite visualizar la integridad de la monocapa celular durante la técnica, que deberá mantenerse como un cultivo confluyente y sin alteraciones morfológicamente visibles.

La placa Costar se incuba a 35° C. en agitación (120 rpm) durante 60 minutos.

Terminado el tiempo de contacto entre bacterias y células epiteliales, la placa se mantiene a 4° C. y se lava cada pocillo tres veces con tampón fosfato salino pH = 7.2 frío, para eliminar las bacterias no adheridas. Las monocapas se visualizan para comprobar si se han producido efectos citotóxicos debido a la adición de las bacterias.

A continuación se añade un ml de dodecilsulfato sódico al 0.5 % (p/v) para solubilizar la muestra y se incuba a 35° C. en agitación (120 rpm) durante una hora.

Posteriormente de cada pocillo se toman alícuotas de 200 ul, y se transfieren a viales, que se adicionan con 3 ml. de líquido de centelleo Cumene (Aqua Luma Plus, Lumac/3 M. Netherlands). Por otro lado para determinar la cantidad de radioactividad total, de las suspensiones bacterianas iniciales ya sean con o sin tratamiento antimicrobiano y previamente a su inoculación en los pocillos, se toman alícuotas de 100 ul. y se añade 3 ml. de líquido de centelleo.

La lectura de los viales se realiza en un contador de radiaciones beta (LKB Wallac 1210

Ultravioleta. Sween).

Además de las suspensiones bacterianas iniciales se realiza un recuento de colonias en agar triptícaso de soja.

Todos los experimentos se realizaron como mínimo 2 veces en días diferentes.

Los resultados se expresan como el porcentaje de adherencia de las bacterias, realizándose la evaluación de 2 formas:

1. Porcentaje de radioactividad bacteriana asociada a la superficie celular (adherencia), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de adherencia} = \frac{\text{número de cpm/pocillo}}{\text{número de cpm total}} \times 100$$

2. Número de bacterias adheridas a la superficie celular, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número de bacterias adheridas} = \frac{\text{número de cpm/pocillo}}{\text{número de cpm/ml.}} \times \text{núm.UFC/ml.}$$

Para su mejor comparación en las tablas de resultados, se expresa como el porcentaje de inhibición de la adherencia de bacterias con tratamiento antimicrobiano.

crobiano con respecto al control sin tratamiento antibiótico.

Tratamiento estadístico

La significación estadística se realizó mediante:

- t-Student, considerando estadísticamente significativos valores cuya $p < 0.05$. En pequeñas muestras.
- Test de diferencias de medias basado en la distribución normal, considerando estadísticamente significativo valores de $p \leq 0.05$ (72).

RESULTADOS



CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA.

De las 34 cepas no mucoides de P.aeruginosa utilizadas para la determinación de la CMI, se emplearon 5 para realizar el estudio.

Estas cepas procedían de pacientes del Hospital Universitario de Sevilla, habiéndose aislado en dos pacientes con infección urinaria y las tres restantes en hemocultivos de pacientes con septicemia.

La concentración mínima inhibitoria de los seis antimicrobianos para las 5 cepas de P.aeruginosa se muestran en la Tabla 2.

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE SUSTANCIA MUCOIDE.

Realizada mediante la técnica de tinción con safranina de las paredes del tubo, ninguna de las cepas estudiadas mostró producción de sustancia mucoide.

ESTUDIO DE LA HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE.

El estudio de la hidrofobicidad de superficie bacteriana se realizó utilizando un sistema bifásico agua-xileno. Los resultados se expresan como el porcentaje de hidrofobicidad de superficie bacteriana, es decir que 100 % correspondería a la cepa más hidrófoba y 0 % a la cepa más hidrófila.

Los valores obtenidos oscilaron en nuestra serie desde un 60 % correspondiente a la cepa más hidrófoba (cepa 1) hasta un 10 % correspondiente a la cepa más hidrófila (cepa 4), con diversos valores intermedios para el resto de las cepas. Estos resultados se obtuvieron cuando las bacterias se incubaron durante 18 horas, según describe la técnica original.

Cuando comparamos el porcentaje de hidrofobicidad de las bacterias tras 4 y 18 horas de incubación, no observamos variaciones significativas.

Al estudiar la influencia de las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la hidrofobicidad de superficie de P.aeruginosa, al realizar el pretratamiento de las bacterias con los antimicrobianos a una concentración de 1/4, 1/8 y 1/16 de la CMI durante 4 horas, en ningún caso los porcentajes de hidrofobicidad de las cepas se modificó de manera significativa, con respecto al porcentaje de hidrofobicidad del control no sometido al tratamiento antibiótico. Resultados similares obtuvimos con las bacterias preincubadas con los distintos antimicrobianos durante 18 horas.

Los resultados obtenidos con cada cepa bacteriana y con cada antimicrobiano, se muestra en las Tablas 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

ADHERENCIA DE P.AERUGINOSA A CELULAS EPITELIALES. METODO VISUAL.

Se estudió la adherencia in vitro de 5 cepas de P.aeruginosa no mucoides a células epiteliales de una línea celular continúa, procedente de carcinoma epidermoide de nasofaringe humano (Kb).

Realizamos el estudio para evaluar la influencia de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos (1/4, 1/8 y 1/16 CMI) en la preincubación de las bacterias, previamente al período de contacto con las células durante el proceso de adherencia. Además intentamos descubrir si el tiempo de tratamiento (4 y 18 horas) de las bacterias con los antimicrobianos, influía de manera significativa en la adherencia.

En esta técnica los resultados se obtienen contabilizando el número de bacterias adheridas por célula epitelial, para lo cual se contaron 40 células por experimento. Para valorar mejor estos datos, realizamos la media aritmética \pm error standard de los valores obtenidos en cada experimento con cada una de las cepas y de los resultados globales de las 5 cepas; con la observación de que las cifras reflejadas en las tablas además constituyen como mínimo la media de 2 experimentos, realizados por duplicado.

Para establecer comparaciones entre distintos parámetros, se expresa como el porcentaje de inhibición de la adherencia de las bacterias sometidas al contacto con un determinado antimicrobiano con respecto al control sin antibiótico.

Al exponer los resultados, nos referiremos a los valores obtenidos al realizar el pretratamiento bacteriano con 1/4 de la CMI para cada antimicrobiano y

se mencionaran los datos globales de las 5 cepas bacterianas empleadas.

No encontramos relación entre mayor porcentaje de adherencia a células epiteliales y mayor porcentaje de hidrofobicidad de superficie en las cepas estudiadas.

Al utilizar un aminoglucósido como la amicacina en la preincubación de las bacterias durante 4 horas, se produjo una inhibición de la adherencia del 52 %, así el número de bacterias adheridas por célula epitelial fué 37 ± 0.6 en el control sin tratamiento antimicrobiano, mientras que cuando las bacterias fueron sometidas a un $1/4$ de su CMI se redujo a 18 ± 0.3 . Cuando la incubación se prolongó hasta 18 horas, los valores obtenidos fueron 30 ± 0.6 para el control y 15 ± 0.3 para las bacterias sometidas al tratamiento con $1/4$ CMI. En ambos casos los valores fueron estadísticamente significativos ($p < 0.001$) (Tabla 9 Figura 1). Si comparamos los resultados obtenidos en la reducción de la adherencia cuando sometimos las bacterias al tratamiento con amicacina durante 4 y 18 horas, no observamos variaciones significativas, siendo los porcentajes de inhibición de la adherencia similares (52 y 50 % respectivamente) (Figura 7).

Al emplear una penema, imipenema a un $1/4$ de su CMI observamos una inhibición de la adherencia, siendo en el caso del tratamiento durante 4 horas los valores de 5 ± 0.3 frente a 25 ± 0.6 en el control sin tratamiento antimicrobiano. Al prolongar el tratamiento a 18 horas también se observó una inhibición de la adherencia, alcanzando valores de 22 ± 0.6 frente a 37 ± 1 del control. En ambos casos la reducción fué estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (Tabla 10, Figura 2). Cuando comparamos los valores de reducción

de la adherencia al incubar las bacterias con imipenema durante 4 y 18 horas, encontramos un efecto más acusado al emplear un período de tratamiento más corto (4 horas), alcanzando valores del 81 %, mientras que al prolongar la incubación hasta 18 horas tan solo obtuvimos una reducción del 40% ($p \leq 0.001$) (Figura 7).

Ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación específicamente activa frente a P.aeruginosa, mostró una buena actividad al reducir la adherencia de las 5 cepas. Cuando preincubamos las bacterias con 1/4 CMI de CZ durante 4 horas, el número de bacterias adheridas por célula epitelial fué de 7 ± 0.2 , mientras que en el control sin tratamiento fué de 25 ± 0.5 . Los resultados obtenidos al prolongar el tratamiento antimicrobiano hasta 18 horas fueron 5 ± 0.2 frente a 25 ± 0.5 para el control. Los valores obtenidos en ambos tiempos con respecto al control, fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0.001$) (Tabla 11, Figura 3). Con este antimicrobiano se detectó un incremento en la inhibición de la adherencia al prolongar el tiempo de tratamiento, cuando comparamos las cifras obtenidas tras la incubación de P.aeruginosa con CZ durante 4 y 18 horas (72 y 82 % respectivamente), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$), (Figura 7).

Ciprofloxacina a 1/4 CMI durante 4 horas produjo una disminución del número de bacterias adheridas de 6 ± 0.2 frente a 32 ± 0.5 del control. Cuando se prolongó la incubación de las bacterias con CP durante 18 horas, los valores obtenidos fueron 10 ± 0.2 frente a 33 ± 0.4 del control sin tratamiento antimicrobiano. Ambas cifras con respecto al control fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.001$) (Tabla 12, Figura 4). Al realizar la comparación entre el porcentaje de

inhibición de la adherencia, al utilizar bacterias tras 4 y 18 horas de incubación con el antimicrobiano, observamos que durante el tiempo de tratamiento más corto (4 horas) la inhibición de la adherencia fué mayor (82 %) que cuando el período se prolongó a 18 horas (68 %). Esta diferencia fué estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$) (Figura 7).

Cuando incubamos P.aeruginosa con 1/4 CMI de ofloxacina durante 4 horas, el número de bacterias por célula epitelial fué 12 ± 0.4 frente a 37 ± 0.5 del control sin tratamiento antibiótico. Al prolongar el tratamiento con OF hasta 18 horas, los valores obtenidos fueron 13 ± 0.3 frente a 36 ± 0.5 del control. Ambos valores con respecto al control fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0.001$) (Tabla 13, Figura 5). Al comparar los porcentajes de inhibición de la adherencia cuando preincubamos las bacterias durante 4 y 18 horas, las cifras obtenidas fueron similares (68 y 64 %) (Figura 7).

La última quinolona probada, norfloxacin, produjo una reducción de la adherencia similar a ofloxacin. Cuando las bacterias se incubaron con 1/4 CMI de NF durante 4 horas, el número de bacterias adheridas por célula epitelial fué 12 ± 0.3 frente a 32 ± 0.5 del control sin tratamiento antimicrobiano. Al continuar la incubación hasta 18 horas los valores se mantuvieron similares (Tabla 14, Figura 6). En ambos casos la reducción de la adherencia fué estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$), siendo el porcentaje de inhibición de la adherencia del 63 % tanto si el período de incubación fué de 4 o de 18 horas (Figura 7).

Analizando los resultados globalmente, todos los



antimicrobianos produjeron una reducción en el número de bacterias adheridas por célula epitelial, cuando realizamos la comparación con las mismas bacterias sin tratamiento antimicrobiano.

De las tres concentraciones subinhibitorias empleadas, se aprecia un efecto más marcado en la inhibición de la adherencia con la concentración más elevada, es decir $1/4$ CMI, siendo de menor cuantía con $1/8$ y aún menor con $1/16$ CMI. En cualquier caso estos hallazgos que muestran una dosis dependencia, son estadísticamente significativos.

Con la excepción de amicacina, los antimicrobianos ensayados en la técnica de adherencia en concentraciones subinhibitorias, produjeron alteraciones morfológicas de P.aeruginosa visibles al microscopio óptico, consistiendo en formas filamentosas para imipenema, ceftazidima y las tres quinolonas. Estas formas aberrantes fueron de mayor longitud, al emplear los antimicrobianos a $1/4$ CMI, siendo células de apariencia normal con $1/16$ CMI. Además observamos que estas formas bacterianas se adherían en muy pequeña proporción a las células epiteliales, siendo por el contrario las bacterias aparentemente normales las que visualizamos adheridas.

No encontramos ninguna disposición característica en el agrupamiento de P.aeruginosa en las células epiteliales, sin embargo la gran mayoría de microorganismos se adhirieron al borde libre de la célula epitelial, en menoscabo del cuerpo celular.

ADHERENCIA DE P.AERUGINOSA A CELULAS EPITELIALES. METODO RADIOMETRICO.

Se estudió la adherencia in vitro de las 5 cepas de P.aeruginosa a células epiteliales procedentes de una línea continua, mediante un método de lectura radiométrico.

Realizamos esta experiencia para evaluar la influencia de concentraciones subinhibitorias (1/4 CMI) de los seis antimicrobianos antes mencionados, en tres situaciones relacionadas con el proceso de adherencia bacteriana. En primer lugar establecer si la preincubación con concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos de las células epiteliales durante 18 horas, se traducía en alteración de la adherencia bacteriana. En segundo lugar evaluar si la acción de concentraciones subinhibitorias de estos antimicrobianos durante 18 horas sobre P.aeruginosa producía alteraciones que se reflejaran en una modificación de su capacidad adhesiva. En último lugar estudiar si en el momento en que se produce la interacción entre bacterias y células, la presencia de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos producen algún tipo de modificación en el proceso de adherencia.

1. Influencia que sobre la adherencia tiene la preincubación de células epiteliales con concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos (1/4 CMI).

En nuestro estudio la preincubación de células epiteliales con 1/4 CMI de amicacina, imipenema y ceftazidima, prácticamente no tuvo efecto alguno en la adherencia de P.aeruginosa, constituyendo tan solo el 6% del valor obtenido en los controles. Sin embargo las tres quinolonas utilizadas produjeron una inhibición de

la adherencia del 27 %, siendo el número de UFC/pocillo $0.8 \times 10^7 \pm 0.1$, mientras que en el control fué de $1.1 \times 10^7 \pm 0.2$. En ningún caso los valores obtenidos fueron estadísticamente significativos (Tabla 15 y 16).

2. Influencia que sobre la adherencia tiene la preincubación de P.aeruginosa con concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos (1/4 CMI).

Cuando comparamos los valores de inhibición de la adherencia de P.aeruginosa sometidas al pretratamiento con concentraciones subinhibitorias, con respecto a los controles sin tratamiento antibiótico, observamos valores cuantitativamente mayores cuando no solo valoramos el número de cuentas por minuto (cpm) asociadas a la superficie celular, obtenida por la lectura de los viales en el contador de centelleo, sino que además mediante el recuento bacteriano en agar, contabilizamos cuantas unidades formadoras de colonias (UFC) corresponden a esas cuentas por minuto. En principio se podría atribuir este fenómeno, al hecho de que ciertos antimicrobianos utilizados producen bacterias morfológicamente alteradas. Estas formas filamentosas poseen un volumen celular aumentado con respecto a una bacteria normal, y por lo tanto también es mayor la radioactividad emitida al adherirse a las células. Cuando averiguamos cuantas unidades formadoras de colonias corresponden a esa radiactividad bacteriana, el valor obtenido es menor. Todo ello se traduce en que los valores de inhibición de la adherencia sean más acusados cuando evaluamos el número de UFC adheridas a las células. Sin embargo, obtuvimos los mismos resultados cuando utilizamos amicacina, que no produce formas visualmente anómalas.

En la exposición nos referiremos a los datos obtenidos al valorar el número de unidades formadoras

de colonias adheridas a la superficie celular.

Con la utilización de amicacina en la preincubación de las bacterias durante 18 horas, se produjo una inhibición de la adherencia de hasta el 62%; así el número de UFC adheridas a la superficie celular fué $1.8 \times 10^7 \pm 0.3$ en el control sin tratamiento antimicrobiano, mientras que cuando las bacterias fueron sometidas a $1/4$ CMI se redujo a $0.7 \times 10^7 \pm 0.1$ (Tabla 17, Figura 8). Esta disminución observada fué estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

Cuando el crecimiento de P.aeruginosa se hizo en presencia de concentraciones subinhibitorias de imipenema ($1/4$ CMI), obtuvimos valores de adherencia de $0.8 \times 10^7 \pm 0.3$ UFC adheridas a la superficie celular, frente a $1.8 \times 10^7 \pm 0.3$ del control con las bacterias sin tratamiento antibiótico (Tabla 18, Figura 9). Esta reducción de la adherencia fué estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) y constituyó el 56 %.

En el caso de la preincubación de las bacterias durante 18 horas con ceftazidima en un $1/4$ de su CMI, obtuvimos un porcentaje de inhibición de la adherencia del 91 %, mostrando valores de $0.17 \times 10^7 \pm 0.5$, frente a $1.8 \times 10^7 \pm 0.3$ UFC adheridas a la superficie celular en el control sin tratamiento antibiótico. (Tabla 19, Figura 10). Este valor fué estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$).

Cuando evaluamos los resultados obtenidos con las tres quinolonas, se detectó porcentajes de inhibición de la adherencia en todos los casos superior al 70 %, con respecto al control sin tratamiento previo.

Al exponer P.aeruginosa durante 18 horas a la presencia de ciprofloxacina, (1/4 de su CMI), observamos un porcentaje de inhibición de la adherencia del 78 %. Así el número de UFC adheridas por pocillo fué $1.8 \times 10^7 \pm 0.6$ en el control sin tratamiento antibiótico, frente a $0.4 \times 10^7 \pm 0.1$ cuando se sometieron las bacterias al pretratamiento con CP (Tabla 20, Figura 11). Esta reducción en la capacidad adherente fué estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

El pretratamiento de las bacterias durante 18 horas con concentraciones de ofloxacina (1/4 de su CMI), se tradujo en valores de $0.08 \times 10^7 \pm 0.02$, frente a $1.8 \times 10^7 \pm 0.6$ UFC adheridas a la superficie celular en el control bacteriano sin tratamiento antimicrobiano (Tabla 21, Figura 12). Esto significó una inhibición de la adherencia del 96 %, siendo asimismo este valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Por último, cuando preincubamos P.aeruginosa durante 18 horas con norfloxacina en 1/4 de su CMI, se produjo una inhibición de la adherencia del 73 % ($p = 0.10$). Esto determinó cifras de $0.5 \times 10^7 \pm 0.1$ en las bacterias pretratadas frente a $1.8 \times 10^7 \pm 0.6$ UFC adheridas a la superficie celular en el control sin tratamiento antibiótico (Tabla 22, Figura 13).

En las Figuras 14 y 15, se muestran los resultados obtenidos con cada antimicrobiano de forma comparativa.

3. Influencia de la presencia de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos (1/4 CMI) sobre el proceso de adherencia.

Cuando realizamos el proceso de adherencia en

presencia de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos, la inhibición de la adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales fué de 6 % para ceftazidima, 12 % en el caso de imipenema y ampicacina (Tabla 23), y un 17 % para las tres fluorquinolonas probadas (Tabla 24).

TABLA 2. Concentración mínima inhibitoria de las 5 cepas de P.aeruginosa. CMI (mg/l).

	<u>AMICACINA</u>	<u>IMIPENEMA</u>	<u>CEFTAZIDIMA</u>	<u>CIPROFLOXACINA</u>	<u>OFLOXACINA</u>	<u>NORFLOXACINA</u>
CEPA 1	4	4	2	0.25	2	0.5
CEPA 2	16	2	2	0.25	2	0.5
CEPA 3	4	2	2	0.125	1	0.5
CEPA 4	4	2	2	0.25	2	0.5
CEPA 5	8	2	2	0.25	2	0.5

TABLA 3. Porcentaje de hidrofobicidad de superficie bacteriana. Influencia de la preincubación de P.aeruginosa con sub-CMI de amicacina durante 4 y 18 horas.

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16 CMI</u>
<u>CEPA 1</u>	52	43	47	48
<u>CEPA 2</u>	12	11	12	13
<u>CEPA 3</u>	20	17	19	19
<u>CEPA 4</u>	10	9	11	9
<u>CEPA 5</u>	43	40	44	41
				<u>4 horas</u>
<u>CEPA 1</u>	60	50	54	52
<u>CEPA 2</u>	10	12	10	11
<u>CEPA 3</u>	17	18	15	18
<u>CEPA 4</u>	18	16	17	18
<u>CEPA 5</u>	31	22	27	29
				<u>18 horas</u>

TABLA 4. Porcentaje de hidrofobicidad de superficie bacteriana. Influencia de la preincubación de P.aeruginosa con sub-CMI de imipenema durante 4 y 18 horas.

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16 CMI</u>
<u>CEPA 1</u>	52	45	43	45
<u>CEPA 2</u>	12	13	12	12
<u>CEPA 3</u>	20	19	20	20
<u>CEPA 4</u>	10	10	9	9
<u>CEPA 5</u>	43	40	41	40
				<u>4 horas</u>
<u>CEPA 1</u>	60	51	53	54
<u>CEPA 2</u>	10	11	10	12
<u>CEPA 3</u>	17	15	15	14
<u>CEPA 4</u>	18	13	12	13
<u>CEPA 5</u>	31	28	26	30
				<u>18 horas</u>

TABLA 5. Porcentaje de hidrofobicidad de superficie bacteriana. Influencia de la preincubación de P.aeruginosa con sub-CMI de ceftazidima.

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16 CMI</u>
<u>CEPA 1</u>	52	44	49	47
<u>CEPA 2</u>	12	12	10	12
<u>CEPA 3</u>	20	18	17	19
<u>CEPA 4</u>	10	9	9	10
<u>CEPA 5</u>	43	42	41	42
				<u>4 horas</u>
<u>CEPA 1</u>	60	55	56	52
<u>CEPA 2</u>	10	11	10	10
<u>CEPA 3</u>	17	13	12	13
<u>CEPA 4</u>	18	16	16	15
<u>CEPA 5</u>	31	24	24	22
				<u>18 horas</u>



TABLA 6. Porcentaje de hidrofobicidad de superficie bacteriana. Influencia de la preincubación de P.aeruginosa con sub-CMI de ciprofloxacina duran 4 y 18 horas.

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16 CMI</u>
<u>CEPA 1</u>	52	54	50	50
<u>CEPA 2</u>	12	9	10	11
<u>CEPA 3</u>	20	18	18	19
<u>CEPA 4</u>	10	9	9	9
<u>CEPA 5</u>	43	35	40	42
				<u>4 horas</u>
<u>CEPA 1</u>	60	55	54	56
<u>CEPA 2</u>	10	8	10	10
<u>CEPA 3</u>	17	13	15	17
<u>CEPA 4</u>	18	15	18	16
<u>CEPA 5</u>	31	33	32	30
				<u>18 horas</u>

TABLA 7. Porcentaje de hidrofobicidad de superficie bacteriana. Influencia de la preincubación de P.aeruginosa con sub-CMI de ofloxacina durante 4 y 18 horas.

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16 CMI</u>
<u>CEPA 1</u>	52	50	51	50
<u>CEPA 2</u>	12	12	10	10
<u>CEPA 3</u>	20	18	19	18
<u>CEPA 4</u>	10	10	9	10
<u>CEPA 5</u>	43	44	41	40
				<u>4 horas</u>
<u>CEPA 1</u>	60	50	50	50
<u>CEPA 2</u>	10	11	10	10
<u>CEPA 3</u>	17	16	17	16
<u>CEPA 4</u>	18	19	18	18
<u>CEPA 5</u>	31	23	24	25
				<u>18 horas</u>

TABLA 8. Porcentaje de hidrofobicidad de superficie bacteriana. Influencia de la preincubación de P.aeruginosa con sub-CMI de norfloxacinina durante 4 y 18 horas.

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16 CMI</u>
<u>CEPA 1</u>	52	50	50	50
<u>CEPA 2</u>	12	11	12	12
<u>CEPA 3</u>	20	20	18	18
<u>CEPA 4</u>	10	9	10	10
<u>CEPA 5</u>	43	42	40	42
				<u>4 horas</u>
<u>CEPA 1</u>	60	47	50	50
<u>CEPA 2</u>	10	10	9	10
<u>CEPA 3</u>	17	16	17	16
<u>CEPA 4</u>	18	14	17	17
<u>CEPA 5</u>	31	24	26	27
				<u>18 horas</u>

TABLA 9. Adherencia de *P.aeruginosa* a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de amicacina. (%) Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento. *: p < 0.05.

4 HORAS					
	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	<u>CMI</u>
CEPA 1	39 ± 1.4	22 ± 0.9 (44%)	27 ± 1 (31%)	27 ± 1 (31%)	
CEPA 2	31 ± 0.2	16 ± 0.6 (48%)	18 ± 0.6 (42%)	20 ± 0.6 (36%)	
CEPA 3	39 ± 1.1	16 ± 0.5 (59%)	19 ± 0.7 (51%)	17 ± 0.5 (57%)	
CEPA 4	44 ± 1.8	20 ± 0.7 (55%)	26 ± 0.9 (41%)	32 ± 1.2 (27%)	
CEPA 5	33 ± 0.8	18 ± 0.5 (46%)	17 ± 0.5 (49%)	21 ± 0.6 (36%)	
MEDIA ± ES	37 ± 0.6	*18 ± 0.3 (52%)	*21 ± 0.4 (43%)	*23 ± 0.4 (38%)	
18 HORAS					
	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	<u>CMI</u>
CEPA 1	36 ± 1.5	20 ± 0.9 (45%)	20 ± 0.6 (45%)	20 ± 0.8 (45%)	
CEPA 2	28 ± 0.8	12 ± 0.4 (57%)	15 ± 0.5 (46%)	16 ± 0.6 (43%)	
CEPA 3	36 ± 0.4	14 ± 0.6 (61%)	17 ± 0.6 (53%)	21 ± 0.6 (42%)	
CEPA 4	17 ± 0.8	10 ± 0.5 (41%)	13 ± 0.7 (24%)	15 ± 0.7 (12%)	
CEPA 5	35 ± 1.1	18 ± 0.8 (49%)	18 ± 0.7 (49%)	25 ± 0.8 (29%)	
MEDIA ± ES	30 ± 0.6	*15 ± 0.3 (50%)	*17 ± 0.3 (44%)	*19 ± 0.3 (37%)	

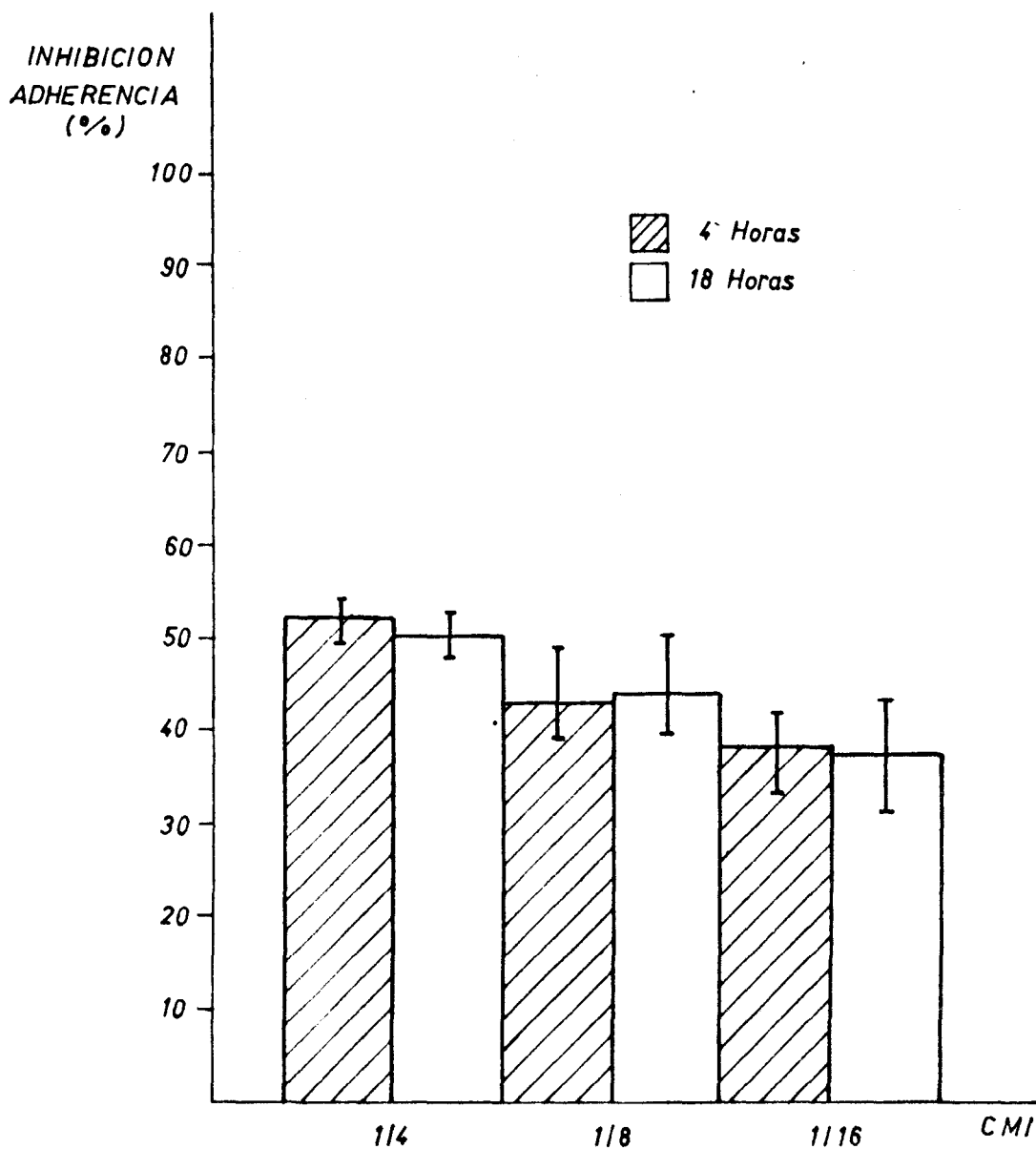


Figura 1. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de amicacina. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento (%).

TABLA 10. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con sub-CMI de imipenema (%) Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento. *p ≤ 0.05.

4 HORAS					
	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	CMI
CEPA 1	32 ± 1.2	5 ± 0.4 (84%)	7 ± 1.6 (78%)	23 ± 0.9 (28%)	
CEPA 2	16 ± 0.8	0.2 ± 0.06 (99%)	0.2 ± 0.06 (99%)	4 ± 0.3 (75%)	
CEPA 3	18 ± 0.8	1.4 ± 0.2 (92%)	4 ± 0.3 (78%)	11 ± 0.7 (39%)	
CEPA 4	30 ± 1.1	15 ± 0.7 (50%)	24 ± 0.9 (20%)	27 ± 1 (10%)	
CEPA 5	29 ± 0.8	5 ± 0.3 (83%)	10 ± 0.4 (66%)	16 ± 0.5 (48%)	
MEDIA ± ES	25 ± 0.6	* 5 ± 0.3 (81%)	*9 ± 0.5 (64%)	*16 ± 0.5 (36%)	

18 HORAS					
	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	CMI.
CEPA 1	66 ± 2	39 ± 1.8 (41%)	40 ± 1.8 (40%)	48 ± 1.1 (28%)	
CEPA 2	21 ± 0.8	12 ± 0.6 (43%)	16 ± 0.7 (24%)	20 ± 0.8 (5%)	
CEPA 3	22 ± 1.1	16 ± 0.4 (27%)	21 ± 0.4 (5%)	21 ± 0.8 (5%)	
CEPA 4	40 ± 1.7	28 ± 0.9 (30%)	30 ± 1.1 (25%)	30 ± 1.1 (25%)	
CEPA 5	36 ± 0.9	16 ± 0.5 (56%)	22 ± 0.7 (39%)	25 ± 0.7 (31%)	
MEDIA ± ES	37 ± 1	* 22 ± 0.6 (40%)	*26 ± 0.6 (30%)	*29 ± 0.4 (22%)	

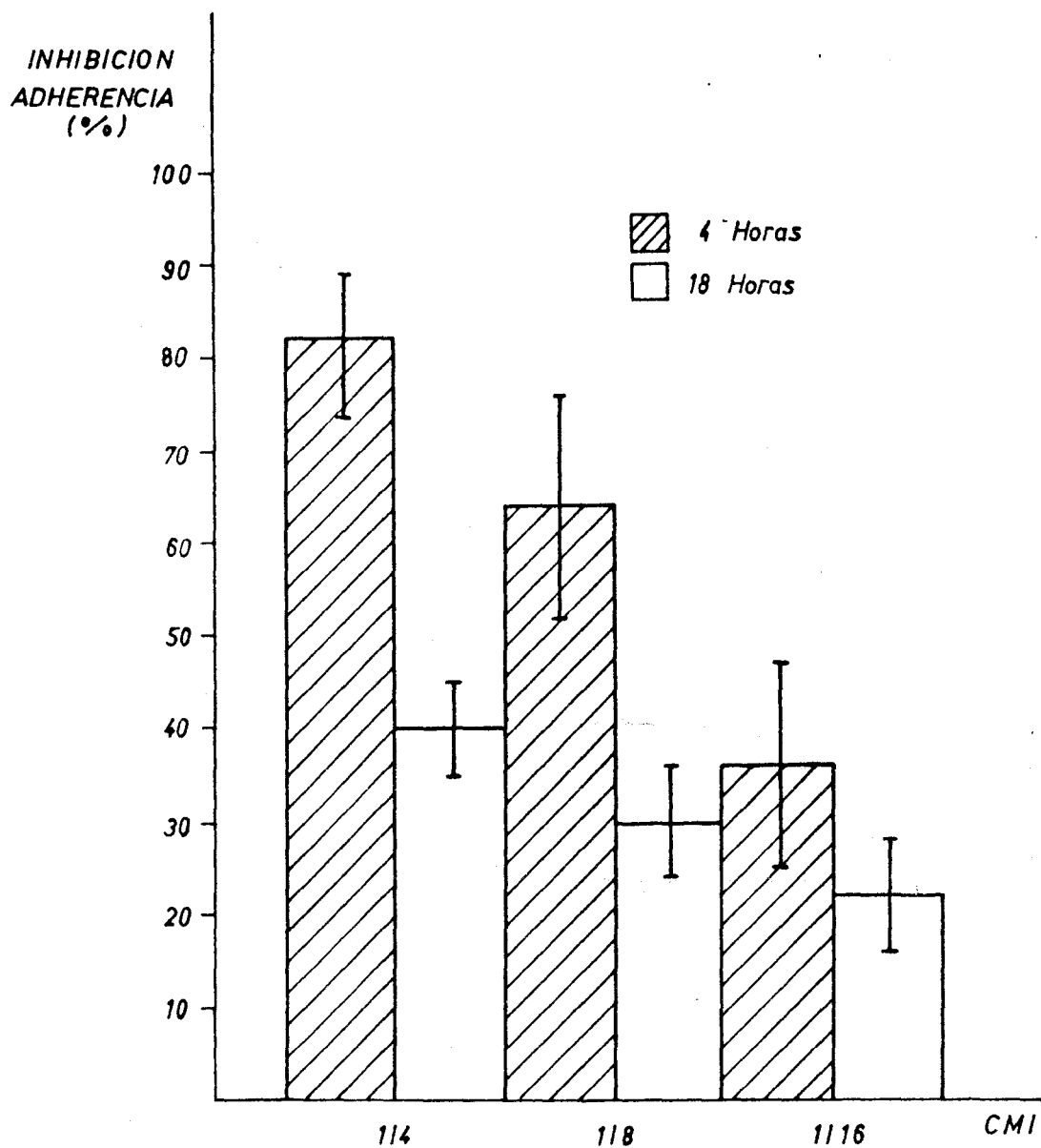


Figura 2. Adherencia de *P.aeruginosa* a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de imipenema. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento (%).

TABLA 11. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con sub-CMI de ceftazidima. (%) Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento. *p < 0.05.

	4 HORAS				
	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	CMI
CEPA 1	36 ± 1.1	2 ± 0.2 (94%)	6 ± 0.5 (94%)	13 ± 0.8 (64%)	
CEPA 2	16 ± 0.7	5 ± 0.4 (69%)	9 ± 0.5 (44%)	12 ± 0.5 (25%)	
CEPA 3	20 ± 0.7	1 ± 0.2 (95%)	3 ± 0.3 (85%)	8 ± 0.5 (60%)	
CEPA 4	22 ± 0.8	9 ± 0.4 (59%)	9 ± 0.3 (64%)	10 ± 0.4 (55%)	
CEPA 5	30 ± 0.5	16 ± 0.4 (47%)	14 ± 0.5 (54%)	20 ± 0.6 (34%)	
MEDIA ± ES	25 ± 0.5	*7 ± 0.2 (72%)	*8 ± 0.2 (68%)	*13 ± 0.5 (48%)	

	18 HORAS				
	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	CMI
CEPA 1	34 ± 1.2	7 ± 0.4 (80%)	10 ± 0.5 (71%)	24 ± 0.9 (30%)	
CEPA 2	17 ± 0.6	2 ± 0.6 (89%)	8 ± 0.4 (53%)	8 ± 0.5 (53%)	
CEPA 3	20 ± 0.6	2 ± 0.2 (90%)	3 ± 0.3 (85%)	8 ± 0.5 (53%)	
CEPA 4	29 ± 0.9	3 ± 0.2 (90%)	8 ± 0.4 (73%)	20 ± 0.8 (31%)	
CEPA 5	28 ± 0.8	11 ± 0.3 (61%)	13 ± 0.5 (54%)	19 ± 0.7 (32%)	
MEDIA ± ES	25 ± 0.5	*5 ± 0.2 (82%)	*8 ± 0.3 (68%)	*16 ± 0.5 (36%)	

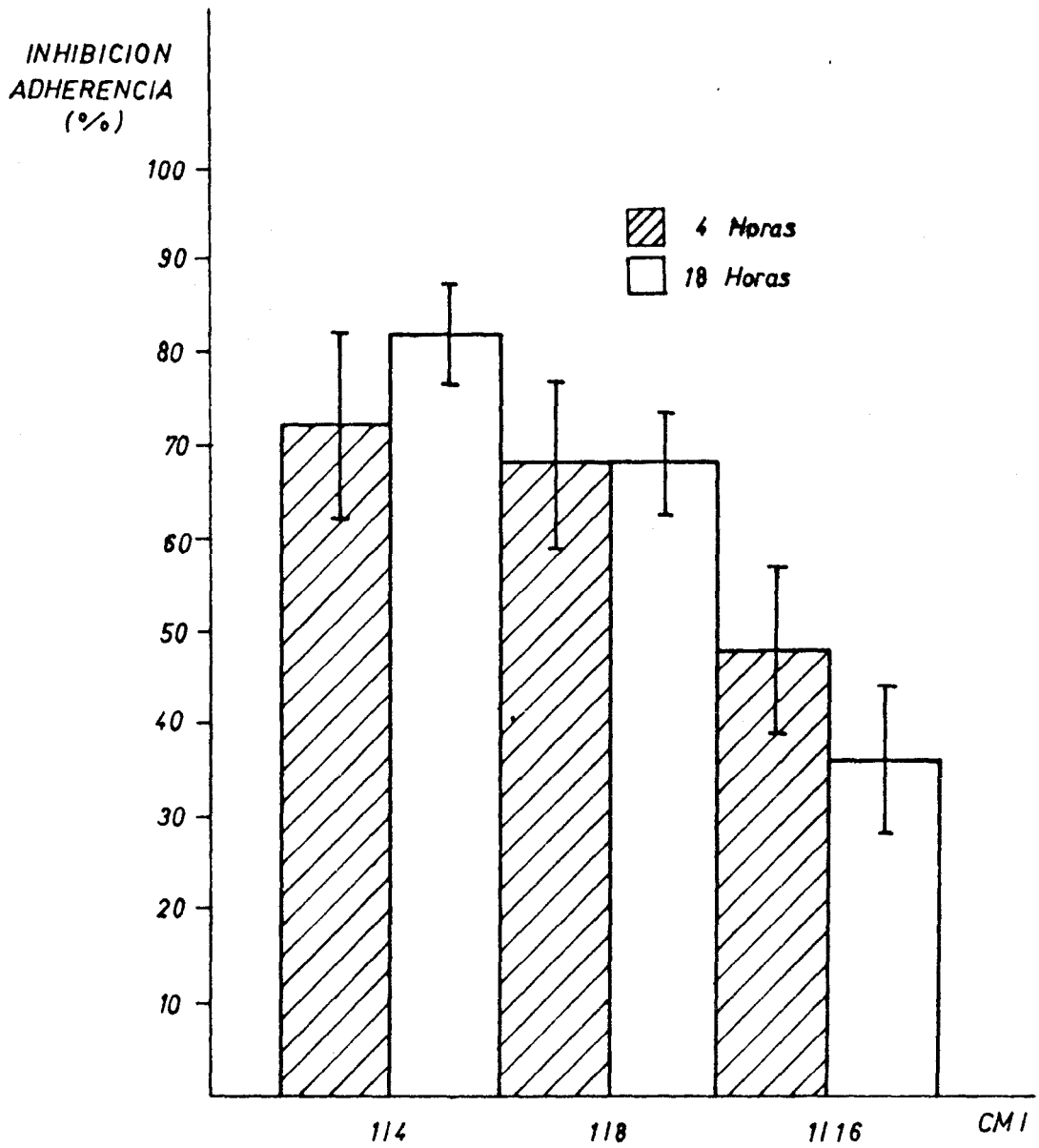


Figura 3. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de ceftazidima. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento (%).

TABLA 12. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con sub-CMI de ciprofloxacina. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento. *p ≤ 0.05.

		4 HORAS			
	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	CMI
CEPA 1	40 ± 1.4	9 ± 0.5 (78%)	12 ± 0.6 (70%)	15 ± 0.7 (63%)	
CEPA 2	32 ± 1	2 ± 0.2 (94%)	6 ± 0.4 (81%)	11 ± 0.6 (66%)	
CEPA 3	28 ± 1	2 ± 0.2 (93%)	2 ± 0.2 (93%)	8 ± 0.4 (72%)	
CEPA 4	29 ± 1	8 ± 0.4 (73%)	14 ± 0.5 (52%)	18 ± 0.6 (38%)	
CEPA 5	30 ± 0.8	8 ± 0.3 (74%)	17 ± 0.5 (44%)	19 ± 0.4 (37%)	
MEDIA ± ES	32 ± 0.5	*6 ± 0.2 (82%)	*10 ± 0.3 (69%)	*14 ± 0.3 (56%)	

		18 HORAS			
	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	CMI
CEPA 1	32 ± 1.1	12 ± 0.6 (63%)	14 ± 0.5 (56%)	22 ± 0.8 (31%)	
CEPA 2	32 ± 0.8	10 ± 0.4 (69%)	22 ± 0.5 (31%)	22 ± 0.5 (31%)	
CEPA 3	33 ± 0.6	10 ± 0.4 (70%)	20 ± 1 (40%)	19 ± 0.4 (43%)	
CEPA 4	32 ± 0.8	8 ± 0.3 (75%)	14 ± 0.5 (56%)	18 ± 0.6 (44%)	
CEPA 5	34 ± 0.8	12 ± 0.4 (65%)	16 ± 0.5 (53%)	20 ± 0.6 (41%)	
MEDIA ± ES	33 ± 0.4	*10 ± 0.2 (68%)	*17 ± 0.3 (49%)	*20 ± 0.3 (40%)	

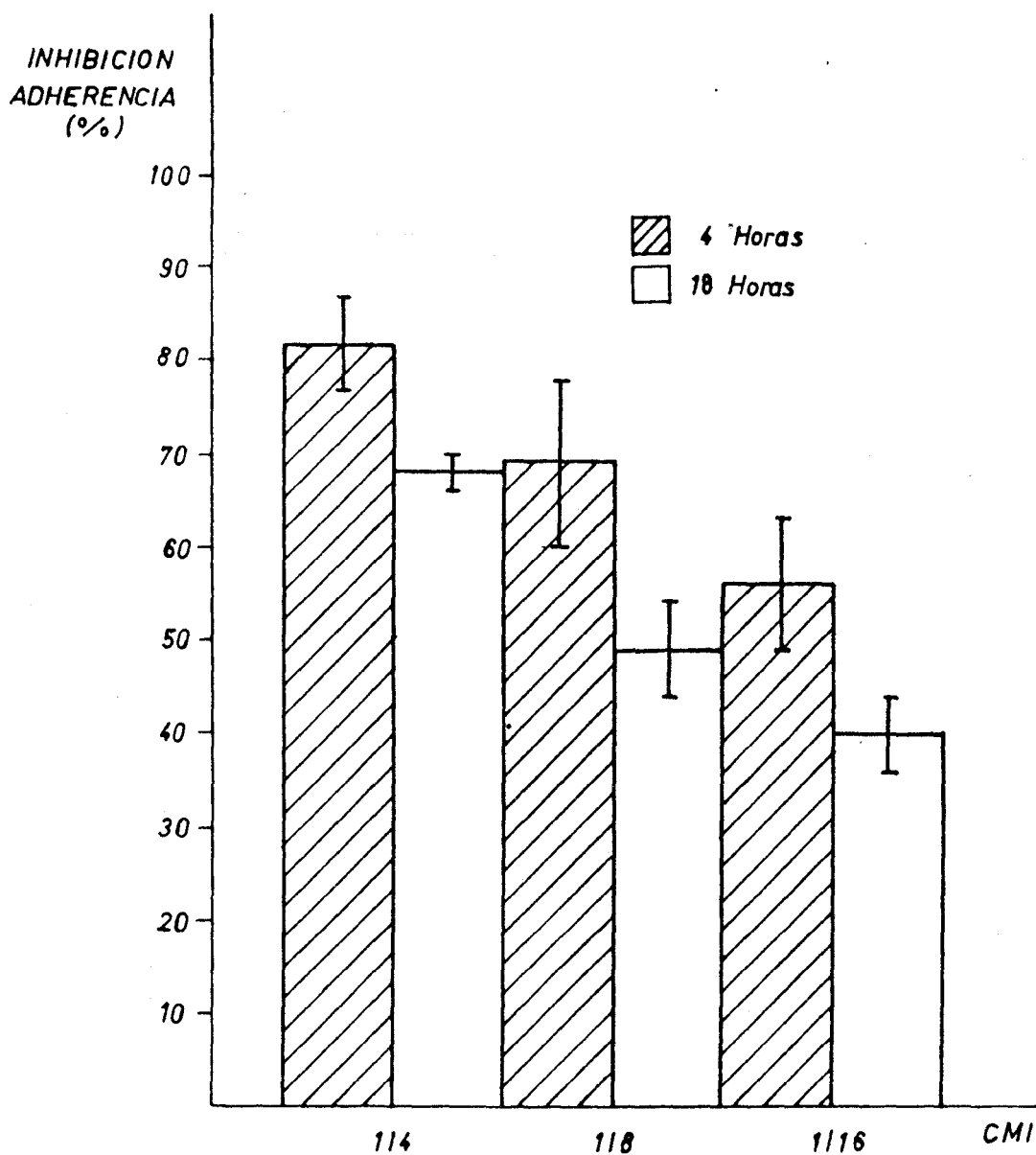


Figura 4. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento (%).

TABLA 13. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con sub-CMI de ofloxacina. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento. *p ≤ 0.05.

4 HORAS

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	CMI
CEPA 1	35 ± 1.1	14 ± 0.8 (60%)	18 ± 0.8 (49%)	28 ± 1	(40%)
CEPA 2	42 ± 1	13 ± 0.5 (69%)	20 ± 0.6 (53%)	26 ± 0.6	(38%)
CEPA 3	43 ± 1.1	13 ± 0.4 (70%)	19 ± 0.6 (56%)	22 ± 0.6	(49%)
CEPA 4	29 ± 1	14 ± 0.9 (52%)	16 ± 0.7 (45%)	14 ± 0.6	(52%)
CEPA 5	37 ± 0.6	7 ± 0.4 (81%)	17 ± 0.5 (63%)	25 ± 0.5	(33%)
MEDIA ± ES	37 ± 0.5	*12 ± 0.4 (68%)	*18 ± 0.3 (52%)	*23 ± 0.4	(38%)

18 HORAS

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	CMI
CEPA 1	31 ± 0.9	12 ± 0.4 (61%)	14 ± 0.5 (55%)	23 ± 0.6	(26%)
CEPA 2	38 ± 1.1	22 ± 0.6 (42%)	22 ± 0.6 (42%)	28 ± 0.7	(27%)
CEPA 3	45 ± 1.1	12 ± 0.4 (74%)	24 ± 0.6 (47%)	28 ± 0.9	(38%)
CEPA 4	27 ± 0.8	9 ± 0.3 (67%)	11 ± 0.3 (41%)	15 ± 0.4	(45%)
CEPA 5	38 ± 0.9	10 ± 0.4 (74%)	15 ± 0.5 (61%)	21 ± 0.9	(45%)
MEDIA ± ES	36 ± 0.5	*13 ± 0.3 (64%)	*17 ± 0.3 (53%)	*23 ± 0.4	(36%)

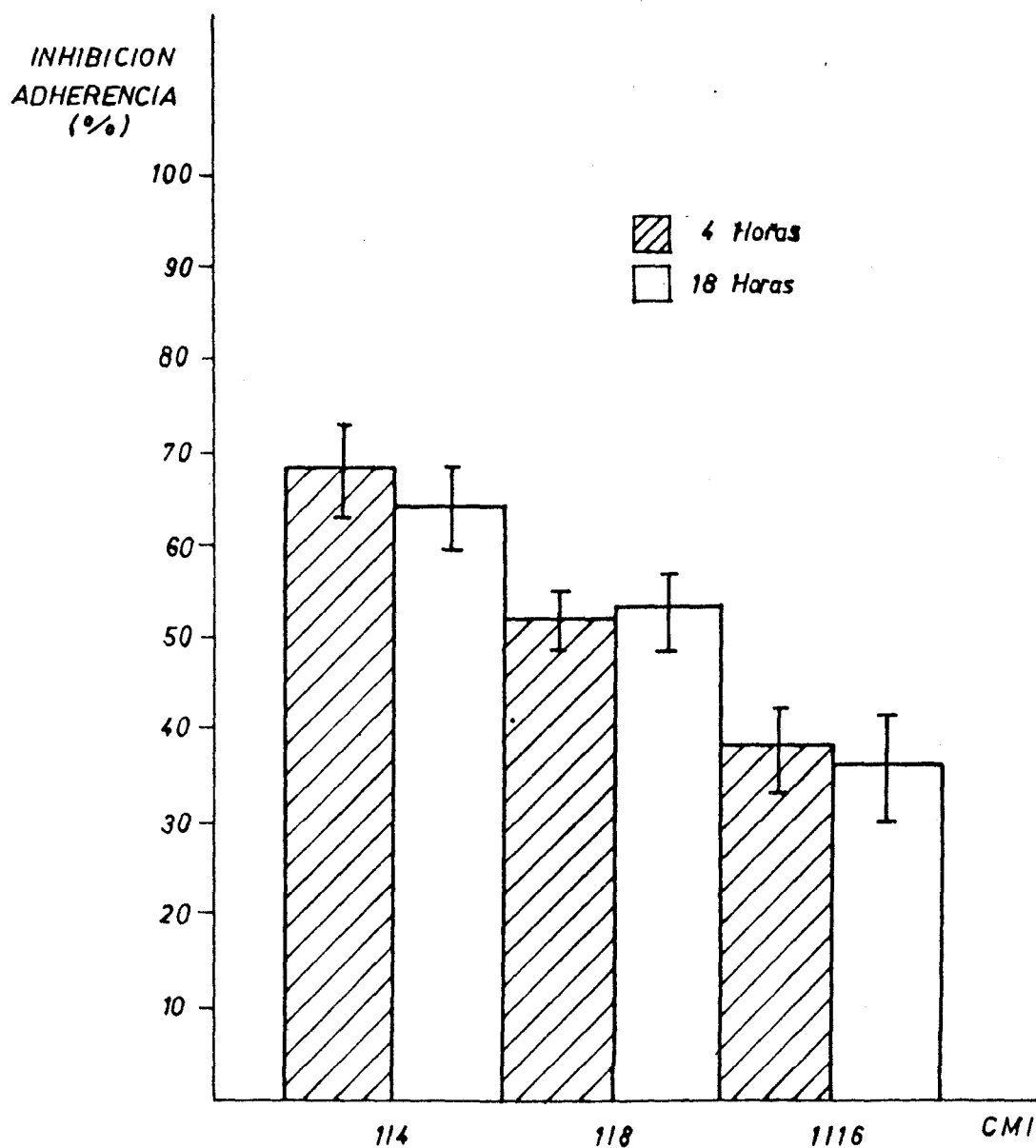


Figura 5. Adherencia de *P.aeruginosa* a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de ofloxacina. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento (%).

TABLA 14. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con sub-CMI de norfloxacina. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento. *p ≤ 0.05.

4 HORAS

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	<u>CMI</u>
CEPA 1	28 ± 1.1	13 ± 0.7 (54%)	18 ± 0.8 (36%)	25 ± 1.5 (11%)	
CEPA 2	34 ± 1	16 ± 0.6 (53%)	21 ± 0.2 (38%)	26 ± 0.8 (24%)	
CEPA 3	41 ± 1.6	11 ± 1 (73%)	19 ± 0.6 (54%)	25 ± 0.6 (39%)	
CEPA 4	24 ± 1	8 ± 0.5 (67%)	14 ± 0.5 (42%)	17 ± 0.7 (29%)	
CEPA 5	31 ± 0.6	10 ± 0.4 (68%)	20 ± 0.2 (36%)	22 ± 0.5 (29%)	
MEDIA ± ES	32 ± 0.5	*12 ± 0.3 (63%)	*18 ± 0.3 (44%)	*23 ± 0.3 (28%)	

18 HORAS

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	<u>CMI</u>
CEPA 1	37 ± 1.1	7 ± 0.5 (81%)	16 ± 0.5 (57%)	22 ± 0.7 (41%)	
CEPA 2	29 ± 0.8	18 ± 0.8 (38%)	20 ± 0.8 (31%)	21 ± 0.7 (28%)	
CEPA 3	34 ± 1.3	14 ± 2.5 (59%)	18 ± 0.6 (47%)	26 ± 0.9 (24%)	
CEPA 4	30 ± 0.8	11 ± 0.5 (64%)	15 ± 0.5 (50%)	22 ± 0.7 (27%)	
CEPA 5	31 ± 0.6	10 ± 0.4 (68%)	20 ± 0.3 (36%)	22 ± 0.5 (29%)	
MEDIA ± ES	32 ± 0.5	*12 ± 0.3 (63%)	*18 ± 0.3 (44%)	*23 ± 0.3 (28%)	

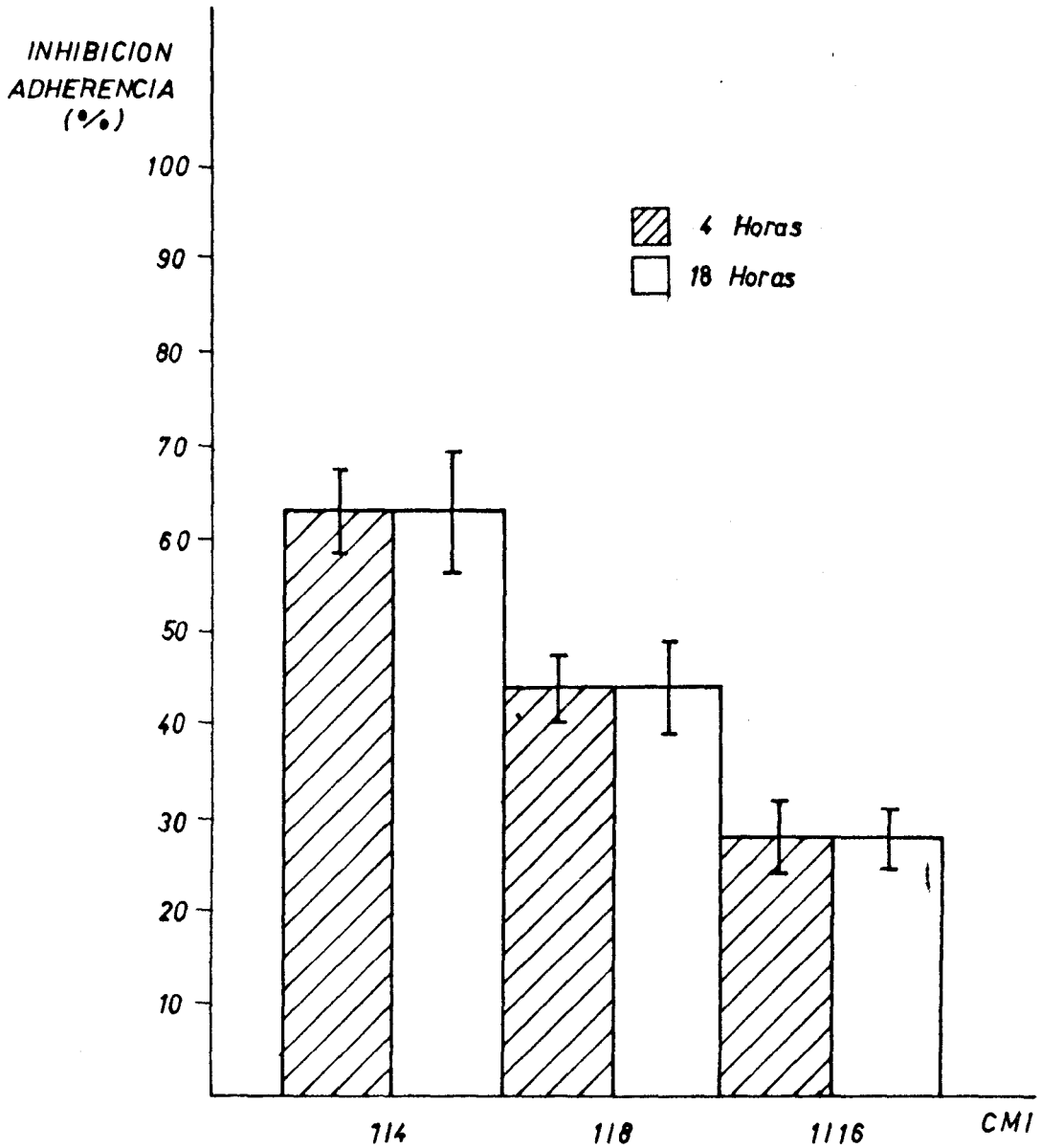


Figura 6. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método visual. Influencia de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de norfloxacin. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento (%).

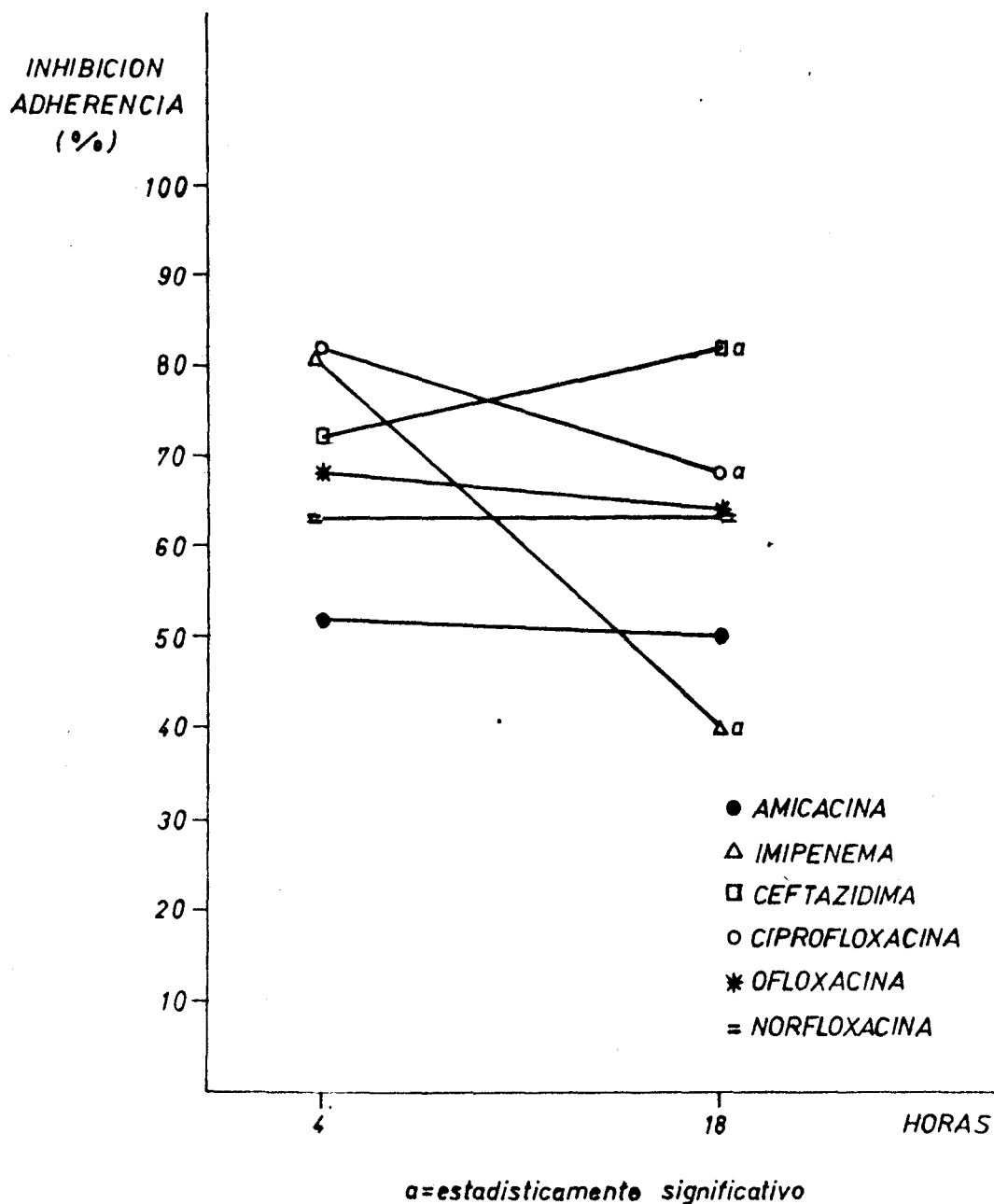


Figura 7. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Comparación entre 4 y 18 horas de pretratamiento antimicrobiano (1/4 CMI). Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos a los controles sin tratamiento (%). a = estadísticamente significativo.

TABLA 15. Influencia de la preincubación de células epiteliales con 1/4 CMI de antimicrobianos, sobre la adherencia de P.aeruginosa. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento.

PORCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>AMICACINA</u>	<u>IMIPENEMA</u>	<u>CEFTAZIDIMA</u>
CEPA 1	32	31 (3%)	29 (10%)	29 (10%)
CEPA 2	20	20 (0)	20 (0)	18 (10%)
CEPA 3	27	22 (19%)	23 (15%)	24 (12%)
CEPA 4	47	47 (0)	47 (0)	44 (7%)
CEPA 5	36	36 (0)	36 (0)	32 (10%)
MEDIA \pm ES	32 \pm 4.6	31 \pm 4.9 (3%)	31 \pm 4.9 (3%)	29 \pm 4.4 (10%)

NUMERO DE UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>AMICACINA</u>	<u>IMIPENEMA</u>	<u>CEFTAZIDIMA</u>
CEPA 1	1.6	1.5 (6%)	1.4 (13%)	1.4 (13%)
CEPA 2	0.9	0.9 (0)	0.9 (0)	0.9 (0)
CEPA 3	2.1	1.8 (14%)	1.9 (10%)	1.9 (10%)
CEPA 4	2.8	2.8 (0)	2.8 (0)	2.6 (7%)
CEPA 5	1.7	1.7 (0)	1.7 (0)	1.6 (6%)
MEDIA \pm ES	1.8 \pm 0.3	1.7 \pm 0.3 (6%)	1.7 \pm 0.3 (6%)	1.7 \pm 0.3 (6%)

TABLA 16. Influencia de la preincubación de células epiteliales con 1/4 CMI de antimicrobianos sobre la adherencia de P.aeruginosa. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento.

PORCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>CIPROFLOXACINA</u>	<u>OFLOXACINA</u>	<u>NORFLOXACINA</u>
CEPA 1	35	27 (23%)	23 (34%)	25 (29%)
CEPA 2	17	14 (18%)	14 (18%)	14 (18%)
CEPA 3	18	16 (12%)	14 (23%)	15 (17%)
CEPA 4	49	47 (4%)	42 (14%)	47 (4%)
CEPA 5	20	16 (20%)	17 (15%)	16 (18%)
MEDIA \pm ES	28 \pm 6	24 \pm 6 (14%)	22 \pm 5 (22%)	23 \pm 6 (18%)

NUMERO DE UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>CIPROFLOXACINA</u>	<u>OFLOXACINA</u>	<u>NORFLOXACINA</u>
CEPA 1	1.4	0.9 (36%)	0.9 (36%)	0.9 (36%)
CEPA 2	1.2	1.1 (8%)	1.1 (8%)	1.1 (6%)
CEPA 3	0.8	0.6 (25%)	0.5 (38%)	0.6 (25%)
CEPA 4	0.4	0.4 (0)	0.4 (0)	0.4 (0)
CEPA 5	1.5	1.2 (20%)	1.3 (14%)	1.2 (20%)
MEDIA \pm ES	1.1 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1 (27%)	0.8 \pm 0.1 (27%)	0.8 \pm 0.1 (27%)

TABLA 17. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de amicacina. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento. *p ≤ 0.05.

PORCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>
CEPA 1	32 ± 0.07	21 ± 0.7 (35%)
CEPA 2	20 ± 0.5	12 ± 2 (40%)
CEPA 3	27 ± 0.3	16 ± 6 (41%)
CEPA 4	47 ± 8	30 ± 8 (36%)
CEPA 5	40 ± 2	20 ± 6 (48%)
MEDIA ± ES	33 ± 5	20 ± 3 (40%)

NUMERO DE UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>
CEPA 1	1.6 ± 0.3	0.8 ± 0.01 (54%)
CEPA 2	0.9 ± 0.02	0.4 ± 0.14 (56%)
CEPA 3	2.1 ± 0.01	0.8 ± 0.12 (62%)
CEPA 4	2.8 ± 0.4	1.1 ± 0.17 (61%)
CEPA 5	1.7 ± 0.8	0.4 ± 0.2 (77%)
MEDIA ± ES	1.8 ± 0.3	*0.7 ± 0.1 (62%)

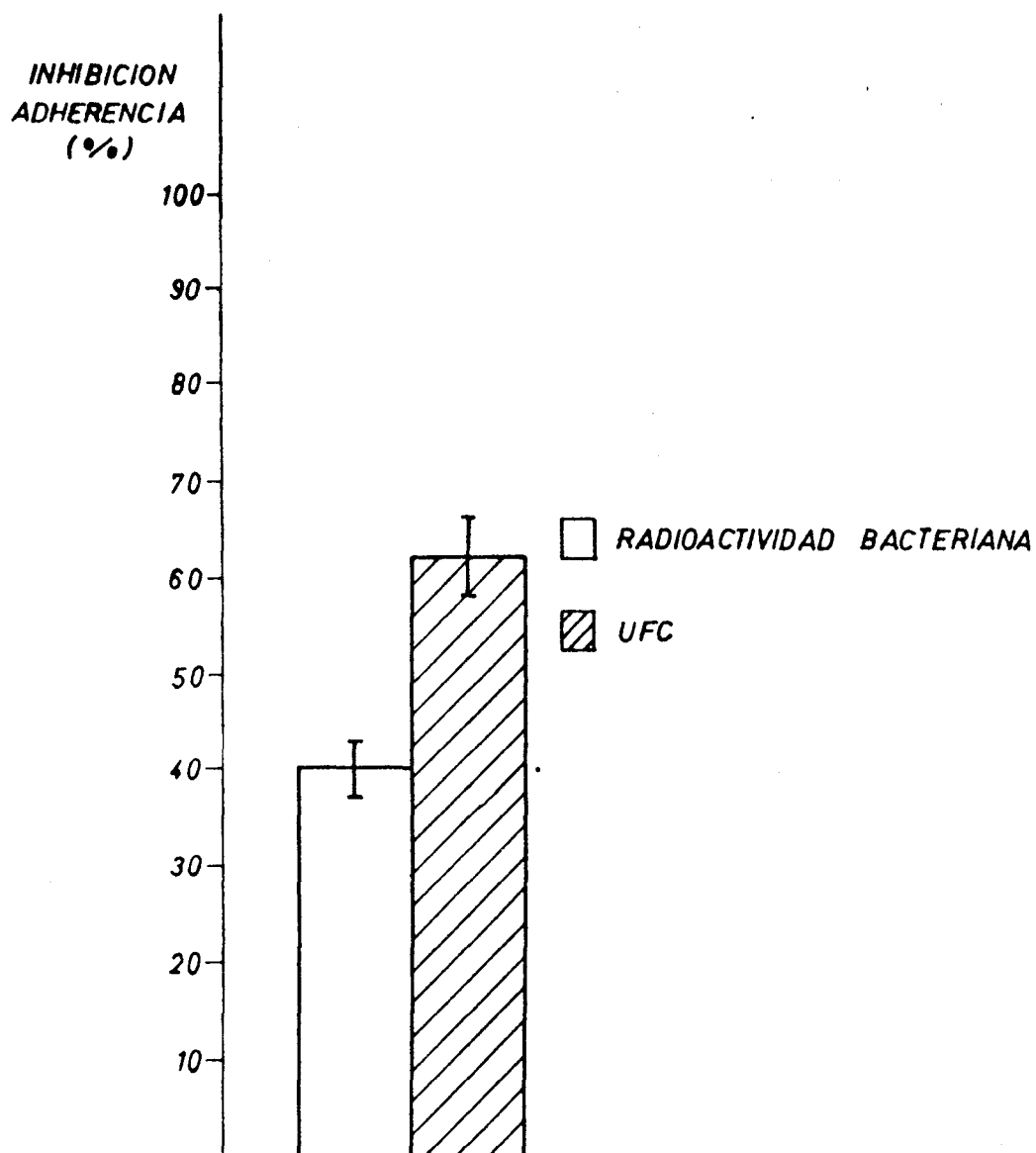


Figura 8. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de amicacina. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento (%).

TABLA 18. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de imipenema. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento. *p ≤ 0.05.

PORCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>	
CEPA 1	32 ± 0.07	12 ± 3	(63%)
CEPA 2	20 ± 0.5	13 ± 1	(35%)
CEPA 3	27 ± 0.3	21 ± 5	(23%)
CEPA 4	47 ± 8	26 ± 3	(45%)
CEPA 5	40 ± 2	22 ± 0.3	(39%)
MEDIA ± ES	32 ± 5	19 ± 2	(41%)

NUMERO DE UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>	
CEPA 1	1.6 ± 0.3	0.7 ± 0.1	(56%)
CEPA 2	0.9 ± 0.02	0.4 ± 0.02	(56%)
CEPA 3	2.1 ± 0.01	0.5 ± 0.3	(76%)
CEPA 4	2.8 ± 0.4	1.9 ± 0.2	(32%)
CEPA 5	1.7 ± 0.8	0.7 ± 0.8	(59%)
MEDIA ± ES	1.8 ± 0.3	*0.8 ± 0.3	(56%)

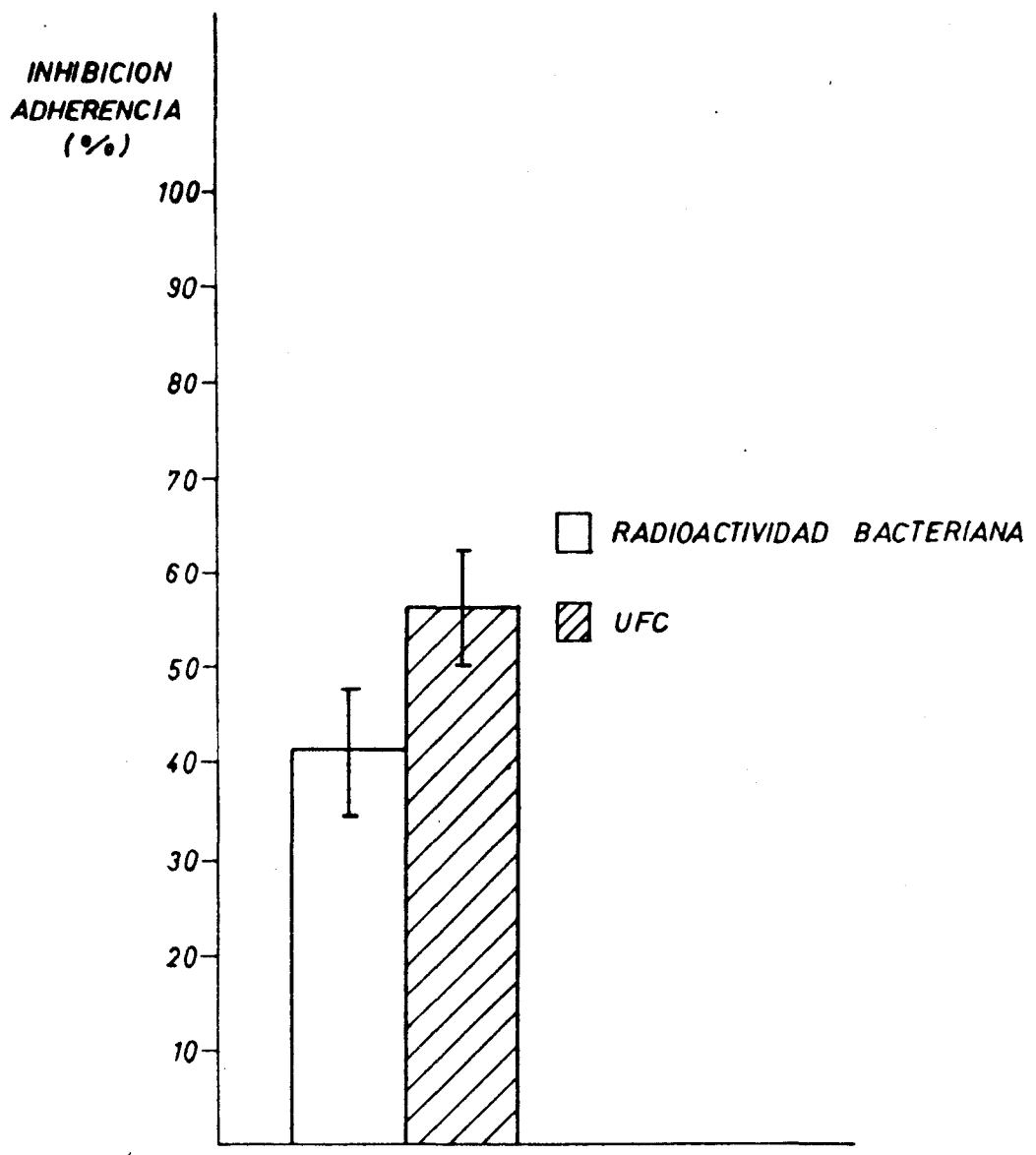


Figura 9. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de imipenema. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento (%).

TABLA 19. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de ceftazidima. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento. *p ≤ 0.05.

PORCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>
CEPA 1	32 ± 0.07	16 ± 4 (50%)
CEPA 2	20 ± 0.5	9 ± 1 (55%)
CEPA 3	27 ± 0.3	16 ± 0.3 (41%)
CEPA 4	47 ± 8	23 ± 0.7 (49%)
CEPA 5	40 ± 2	17 ± 1 (58%)
MEDIA ± ES	33 ± 5	16 ± 2 (52%)

NUMERO UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>
CEPA 1	1.6 ± 0.3	0.1 ± 0.02(94%)
CEPA 2	0.9 ± 0.02	0.04 ± 0.01(96%)
CEPA 3	2.1 ± 0.01	0.3 ± 0.01(86%)
CEPA 4	2.8 ± 0.4	0.1 ± 0.01(96%)
CEPA 5	1.7 ± 0.8	0.3 ± 0.01(82%)
MEDIA ± ES	1.8 ± 0.3	*0.17 ± 0.05(91%)

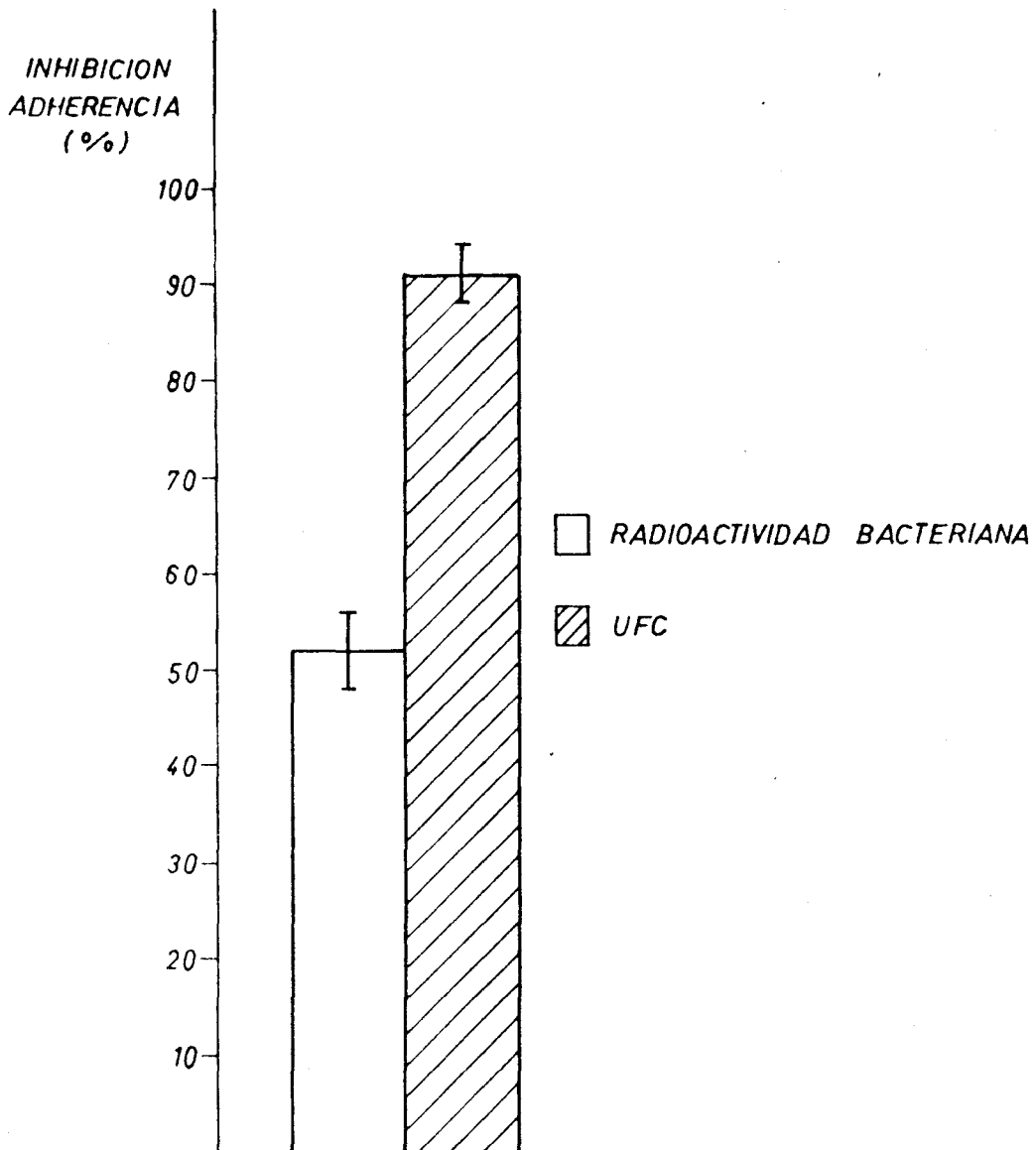


Figura 10. Adherencia de P.aeruginosa a células teliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de ceftazidima. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento (%).



TABLA 20. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de ciprofloxacina. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento. *p < 0.05.

POCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>
CEPA 1	35 ± 1	27 ± 7 (23%)
CEPA 2	17 ± 1	5 ± 0.6 (71%)
CEPA 3	18 ± 0.14	5 ± 4 (73%)
CEPA 4	49 ± 2	13 ± 0.8 (74%)
CEPA 5	20 ± 2	14 ± 1.6 (29%)
MEDIA ± ES	28 ± 6	13 ± 4 (54%)

NUMERO UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>
CEPA 1	1.4 ± 0.04	0.5 ± 0.5 (60%)
CEPA 2	1.2 ± 0.07	0.03 ± 0.01 (98%)
CEPA 3	0.7 ± 0.01	0.2 ± 0.1 (72%)
CEPA 4	4.4 ± 0.1	0.3 ± 0.6 (93%)
CEPA 5	1.5 ± 0.06	0.5 ± 0.5 (66%)
MEDIA ± ES	1.8 ± 0.6	*0.4 ± 0.1 (78%)

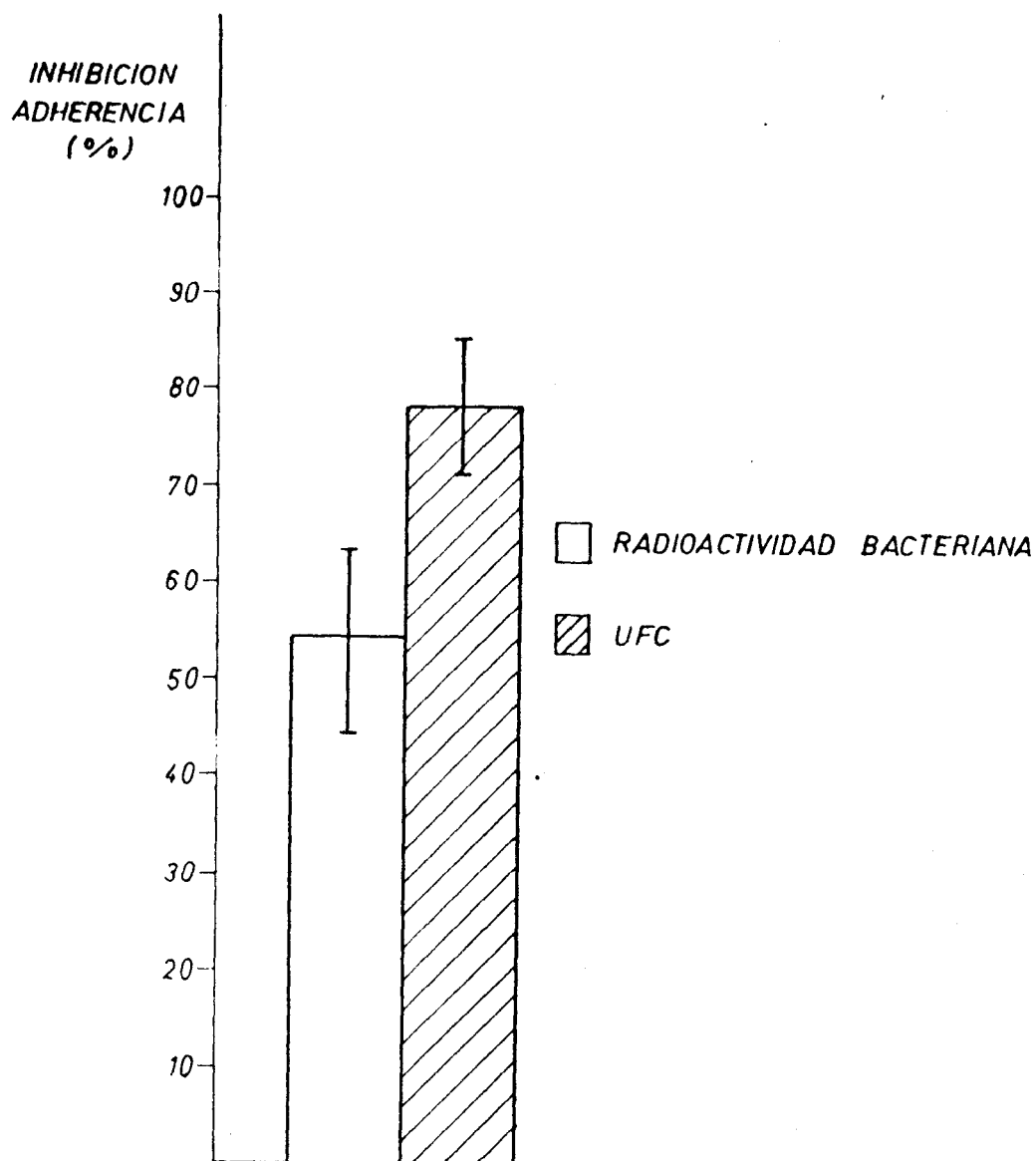


Figura 11. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de ciprofloxacina. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento (%).

TABLA 21. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de ofloxacin. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento. *p ≤ 0.05.

PORCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>
CEPA 1	35 ± 1	13 ± 2 (63%)
CEPA 2	17 ± 1	6 ± 0.3 (65%)
CEPA 3	18 ± 0.14	9 ± 2 (50%)
CEPA 4	49 ± 2	9 ± 0.7 (82%)
CEPA 5	20 ± 2	8 ± 1 (40%)
MEDIA ± ES	28 ± 6	10 ± 1 (64%)

NUMERO DE UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>
CEPA 1	1.4 ± 0.04	0.05 ± 0.01(97%)
CEPA 2	1.2 ± 0.07	0.1 ± 0.01(92%)
CEPA 3	0.7 ± 0.01	0.04 ± 0.01(94%)
CEPA 4	4.4 ± 0.1	0.1 ± 0.01(98%)
CEPA 5	1.5 ± 0.06	0.09 ± 0.03(94%)
MEDIA ± ES	1.8 ± 0.6	*0.08 ± 0.02(96%)

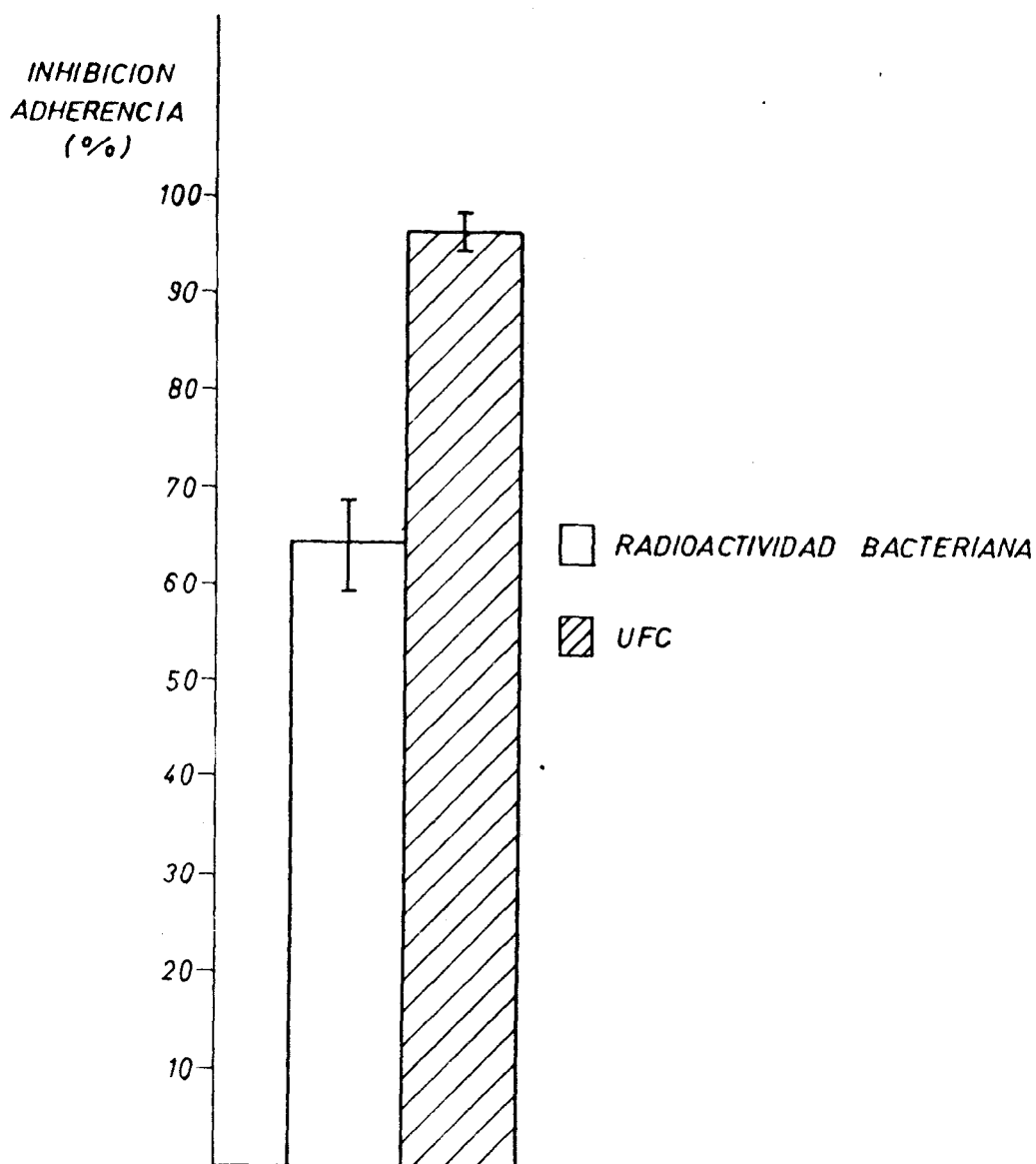


Figura 12. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de ofloxacina. Porcentaje de la inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento (%).

TABLA 22. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de norfloxacin. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento.

PORCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>	
CEPA 1	35 ± 1	31 ± 2	(12%)
CEPA 2	17 ± 1	10 ± 1	(41%)
CEPA 3	18 ± 0.14	6 ± 3	(67%)
CEPA 4	49 ± 2	9 ± 2	(82%)
CEPA 5	20 ± 2	14 ± 3	(33%)
MEDIA ± ES	28 ± 6	15 ± 4	(47%)

NUMERO DE UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>1/4 CMI</u>	
CEPA 1	1.4 ± 0.04	0.8 ± 0.8	(83%)
CEPA 2	1.2 ± 0.07	0.2 ± 0.04	(84%)
CEPA 3	0.7 ± 0.01	0.1 ± 0.06	(86%)
CEPA 4	4.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	(87%)
CEPA 5	1.5 ± 0.06	0.5 ± 0.1	(65%)
MEDIA ± ES	1.8 ± 0.6	0.5 ± 0.1	(73%)

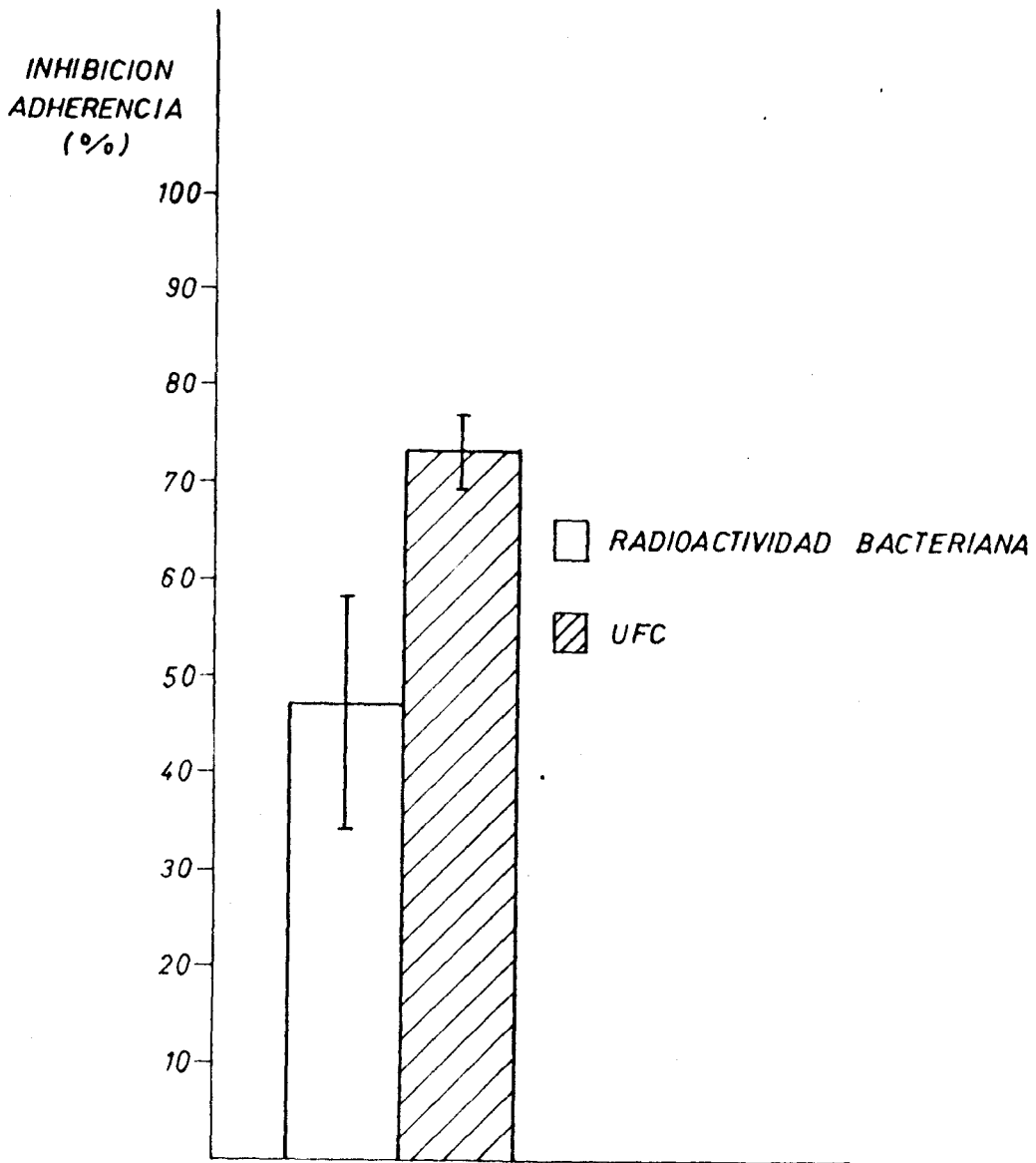


Figura 13. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con 1/4 CMI de norfloxacin. Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento (%).

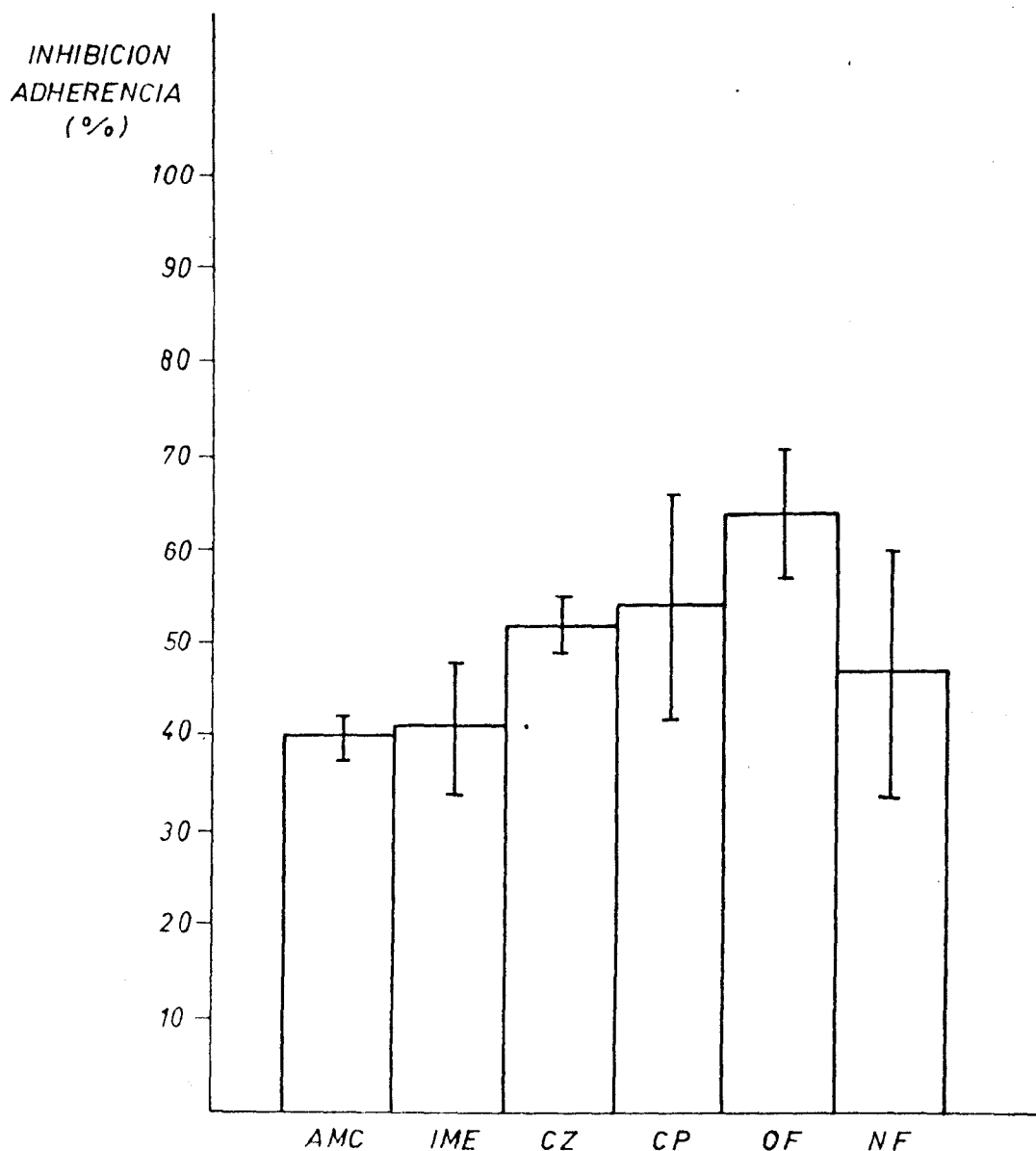


Figura 14. Adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de seis antimicrobianos (Radioactividad bacteriana adherida a la superficie celular). Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento (%).

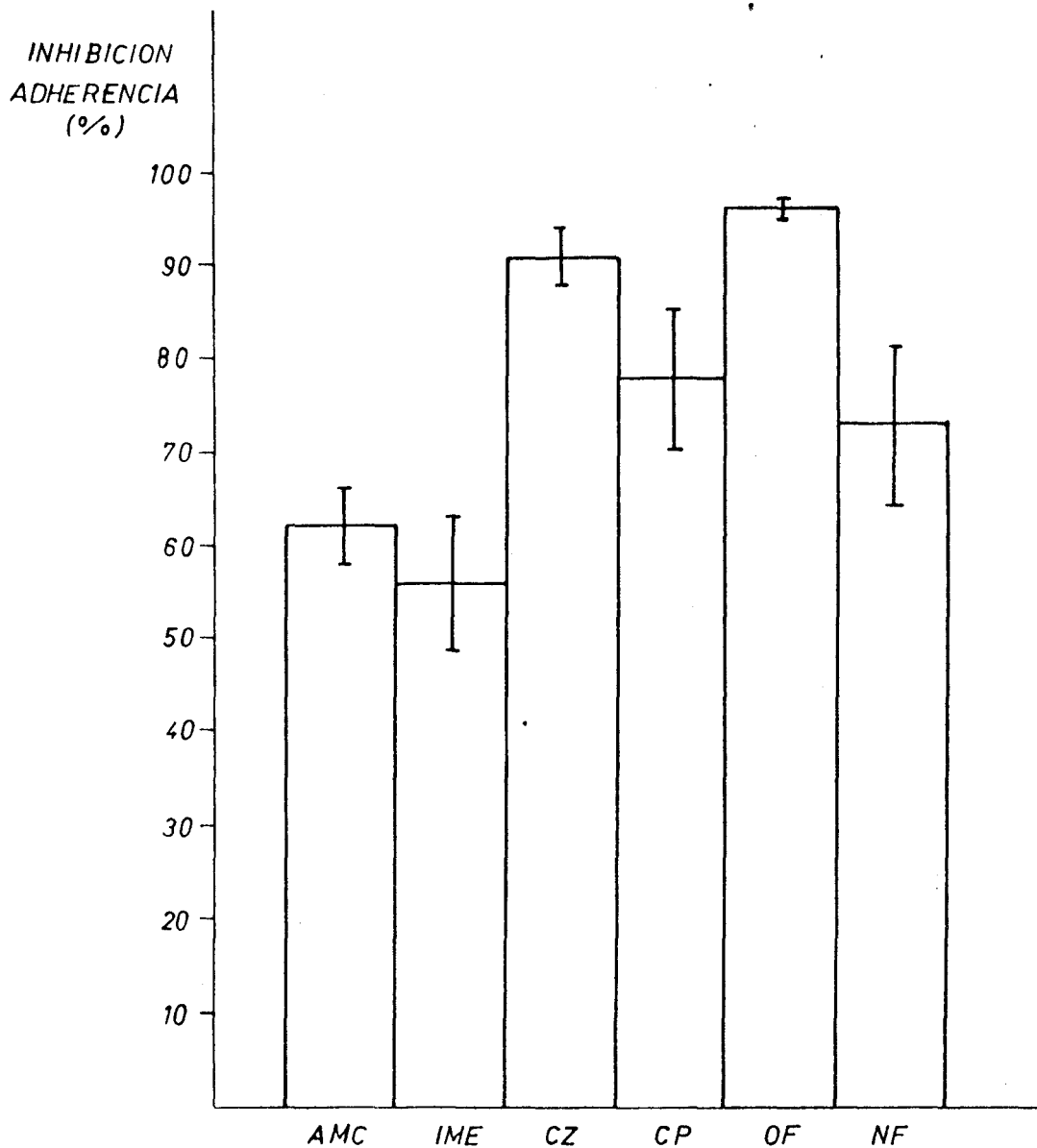


Figura 15. Adherencia de *P.aeruginosa* a células epiteliales. Método radiométrico. Influencia de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de seis antimicrobianos (UFC adheridas a la superficie celular). Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento (%).

TABLA 23. Influencia de la presencia de 1/4 CMI de antimicrobianos durante el proceso de adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento.

PORCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>AMICACINA</u>	<u>IMIPENEMA</u>	<u>CEFTAZIDIMA</u>
CEPA 1	32	30 (6%)	23 (28%)	32 (0)
CEPA 2	20	13 (35%)	21 (0)	18 (10%)
CEPA 3	27	23 (15%)	24 (11%)	21 (22%)
CEPA 4	47	46 (2%)	47 (0)	47 (0)
CEPA 5	36	32 (12%)	28 (23%)	33 (8%)
MEDIA ± ES	32 ± 4.6	29 ± 5.5 (9%)	28 ± 4.8 (13%)	30 ± 5.2 (6%)

NUMERO UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>AMICACINA</u>	<u>IMIPENEMA</u>	<u>CEFTAZIDIMA</u>
CEPA 1	1.6	1.5 (6%)	1.1. (31%)	1.5 (6%)
CEPA 2	0.9	0.6 (34%)	0.9 (0)	0.8 (12%)
CEPA 3	2.1	1.8 (14%)	1.9 (10%)	0.2 (15%)
CEPA 4	2.8	2.8 (0)	2.8 (0)	2.8 (0)
CEPA 5	1.7	1.6 (6%)	1.3 (24%)	1.6 (6%)
MEDIA ± ES	0.8 ± 0.3	1.6 ± 0.3 (12%)	1.6 ± 0.3 (12%)	1.4 ± 0.4 (6%)

TABLA 24. Influencia de la presencia de 1/4 CMI de antimicrobianos durante el proceso de adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales. (%): Porcentaje de inhibición de la adherencia, datos referidos al control sin tratamiento.

PORCENTAJE RADIOACTIVIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL POCILLO

	<u>CONTROL</u>	<u>CIPROFLOXACINA</u>	<u>OFLOXACINA</u>	<u>NORFLOXACINA</u>
CEPA 1	35	29 (17%)	21 (40%)	26 (26%)
CEPA 2	17	14 (15%)	14 (15%)	7 (59%)
CEPA 3	18	17 (6%)	18 (0)	18 (0)
CEPA 4	49	41 (17%)	38 (23%)	44 (10%)
CEPA 5	20	18 (10%)	19 (5%)	19 (5%)
MEDIA ± ES	28 ± 6.3	24 ± 5 (14%)	24 ± 5.2 (14%)	23 ± 6.2 (18%)

NUMERO DE UFC/POCILLO x 10⁷

	<u>CONTROL</u>	<u>CIPROFLOXACINA</u>	<u>OFLOXACINA</u>	<u>NORFLOXACINA</u>
CEPA 1	1.4	0.9 (36%)	0.9 (36%)	1 (29%)
CEPA 2	1.2	0.5 (59%)	0.4 (67%)	0.5 (59%)
CEPA 3	0.8	0.7 (13%)	0.7 (13%)	0.7 (13%)
CEPA 4	4.4	4.3 (2%)	4 (9%)	4 (9%)
CEPA 5	1.5	1.3 (14%)	1.4 (7%)	1.4 (7%)
MEDIA ± ES	1.8 ± 0.6	1.5 ± 0.7 (17%)	1.5 ± 0.6 (17%)	1.5 ± 0.6 (17%)

DISCUSSION

La adherencia de los microorganismos a los tejidos del huésped, ha sido considerada como una etapa importante en la patogenesis de las enfermedades infecciosas. Las diversas investigaciones realizadas para conocer el mecanismo de adherencia de determinadas bacterias se ha traducido en un acercamiento a la modificación o prevención de las infecciones en animales de experimentación y en humanos.

Para que se instaure la infección por un microorganismo, se debe establecer en primer lugar una asociación superficial a la piel o membrana de mucosas, mediante el proceso de adherencia. Es en este momento cuando se produce la colonización, a la que acompañará cierto grado de proliferación bacteriana. Si se aunan diversas condiciones, esta simple colonización progresa a infección, que conllevará como mínimo cierto grado de invasión titular. De este modo se producen alteraciones físicas o funcionales en el lugar de infección o en un

territorio distante de éste. De igual forma, la invasión del patógeno por sí mismo, puede quedar localizada o diseminada a otros lugares (73).

JOHANSON y cols. (74) demostraron experimentalmente, que existía una clara relación entre adherencia y colonización por P.aeruginosa de las células del tracto respiratorio. También se observó que la adherencia "in vitro" de P.aeruginosa a células de la boca de pacientes previamente no colonizados, se incrementaba significativamente después de la cirugía electiva, produciéndose en estos enfermos, posteriormente, un mayor índice de colonización (75). Con estos datos quedó establecida la importancia de la adherencia de este patógeno oportunista, como prerequisite para producir una infección.

Los procesos implicados en el fenómeno de adherencia son muchos y constituyen una serie de acontecimientos complejos.

Los estudios realizados "in vitro" han podido explicar algunos de los factores envueltos en este fenómeno, pero hay que tener en cuenta que las condiciones creadas en el laboratorio son artificiales y existen una serie de circunstancias que interaccionan "in vivo" de manera importante. Por todo ello, los datos obtenidos en estos experimentos, deben extrapolarse a la situación real con cautela.

Hemos estudiado "in vitro" diversos aspectos envueltos en la adherencia de P.aeruginosa no mucoide a células epiteliales humanas procedentes de carcinoma epidermoide de nasofaringe humano. En la literatura se ha descrito la producción de sustancia mucoide, como promotor de la adherencia inespecífica en su primera etapa. Este componente polimérico extracelular sinteti-

zado o excretado por los microorganismos, queda adsorbido al sustrato y con él el microorganismo, favoreciendo la yuxtaposición de ambas estructuras. El método empleado para la detección de slime, fué descrito por CHRISTENSEN y cols. (68). Es una prueba sencilla tanto en su realización como en su interpretación, no presentando grandes variaciones entre distintos ensayos ni entre observadores (76). Aunque inicialmente fuera descrita para *Estafilococos* coagulasa negativo, también ha sido utilizada para otros microorganismos. Ninguna de nuestras cepas mostró producción de sustancia mucoide. MILLER y cols. (69) estudiaron 20 cepas de *P.aeruginosa* no mucoides aisladas de úlceras corneales y soluciones de lentillas contaminadas, obteniendo con este método, resultados similares a los nuestros, excepto en una cepa que fué capaz de promover su adherencia al cristal.

Quizás un hecho limitante en la observación de este dato, sea el bajo número de cepas de nuestro estudio. Otra posible explicación sería que a pesar de las ventajas ortogadas por este test, posea una escasa sensibilidad para la detección de la producción de sustancia mucoide en otros microorganismos distintos de *Staphylococcus epidermidis*. Existen otros métodos disponibles para la producción de sustancia mucoide, pero su realización es más compleja, entre ellos podemos destacar la cromatografía (77,78) o la inmunofluorescencia directa (79).

La presencia de sustancia mucoide en cepas de *P.aeruginosa* además de promover la adherencia a la membrana de células epiteliales, le confiere propiedades antifagocíticas, siendo en este caso fagocitadas en menor proporción por leucocitos polimorfonucleares (16).



Otro de los factores implicados en la primera fase de adherencia bacteriana a las células epiteliales, es la hidrofobicidad de superficie tanto de la superficie del sustrato como del microorganismo. Así la adherencia de diversas especies de Pseudomonas spp marinas a distintas superficies está relacionada con la hidrofobicidad de superficie de estos polímeros (80,81), de tal manera que el número de bacterias adheridas se incrementa al aumentar la hidrofobicidad de los sustratos ensayados. Estos resultados han sido corroborados por MILLER y cols. (69) en experimentos posteriores, en los cuales demuestran que la adherencia de P.aeruginosa no mucoides es mayor a materiales compuestos por superficies hidrofóbicas de baja energía, como el poliestireno, que a aquellas cuyo carácter de superficie es hidrofílico, como el vidrio.

Se ha descrito que algunas cepas de P.aeruginosa tienen la propiedad de hemaglutinar eritrocitos. GARBER y cols. (82) comprobaron que diferentes cepas eran capaces de promover la aglutinación de hematíes procedentes de diversos mamíferos y humanos. Cuando utilizaron agentes que producían la rotura de las uniones hidrofóbicas, se produjo una inhibición de la hemaglutinación, mientras que distintos azúcares y sacáridos, no fueron efectivos en reducir cuantitativamente la aglutinación. Por ello estos autores concluyen que la adherencia de este microorganismo a hematíes, se encuentra mediada por interacciones hidrofóbicas.

También se recoge en la literatura, datos sobre la relación existente entre la hidrofobicidad de superficie bacteriana y la producción de infecciones (83).

La hidrofobicidad de superficie bacteriana puede medirse mediante varios sistemas: adsorción a geles

hidrofóbicos, medición de los ángulos de contacto entre una fase acuosa y la superficie en cuestión, cromatografía de interacción hidrofóbica (84), prueba de agregación de sales (85), y por último mediante la medición indirecta de una porción de la suspensión bacteriana en un sistema acuoso (70).

Para evaluar la hidrofobicidad de superficie de P.aeruginosa, hemos empleado el método descrito por ROSENBERG y cols. (69), que consiste en medir la afinidad de una suspensión bacteriana a un sistema bifásico agua-xileno. Mediante este método, nuestras cepas mostraron valores de hidrofobicidad de superficie que oscilaron desde un 10 % para la cepa más hidrófila, al 60 % para la cepa más hidrófoba, con valores intermedios para el resto. Estos valores no sufrieron grandes modificaciones cuando comparamos la incubación de las bacterias durante 4 y 18 horas, previamente a la realización de la prueba. Por lo cual podríamos deducir que el tiempo de incubación de las bacterias no guarda relación con la expresión de la hidrofobicidad de superficie de las mismas.

Nuestros resultados están de acuerdo con los de SPEERT y cols. (7). Estos autores analizaron la hidrofobicidad de superficie de cinco cepas de P.aeruginosa, mediante un sistema bifásico polietilenglicol-dextrano, cuyo fundamento es similar al utilizado por nosotros. Los valores obtenidos oscilaron desde el 15 % para la cepa más hidrófila al 61 % para la cepa más hidrófoba.

Sin embargo MARCUS y cols. (86), al analizar las propiedades hidrofóbicas de seis cepas de P.aeruginosa no mucoides, mediante la medición de la afinidad bacteriana al sistema bifásico agua-xileno, no encontraron ninguna cepa con esta característica.

No logramos establecer relación entre la procedencia del microorganismo (sangre y orina) y su mayor o menor grado de hidrofobicidad de superficie bacteriana. Sin embargo en otros estudios se encuentran datos confirmatorios de la existencia de una correlación entre mayor hidrofobicidad de superficie bacteriana y la producción de infección. Así LJUNCH y cols. (87) analizando la hidrofobicidad de superficie de P.aeruginosa, procedentes de pacientes con infección del tracto urinario, comprobaron que la mayoría de estas cepas tenían un carácter hidrófobo, aunque el método empleado fuera la prueba de agregación de sales, que también mide la carga de superficie bacteriana. De todas estas cepas, tan solo dos mostraban esta característica cuando se empleó otro método de medición: cromatografía de interacción hidrofóbica.

A la vista de todos estos resultados, un factor determinante en el análisis de diversos resultados al evaluar la hidrofobicidad de superficie bacteriana, es la diferente metodología empleada por distintos autores, por lo cual es difícil establecer conclusiones comparativas.

La mayoría de los estudios de adherencia se han realizado "in vitro". De forma esquemática estos métodos consisten en exponer suspensiones bacterianas estandarizadas a suspensiones de células epiteliales, endoteliales o monocapas de cultivos celulares. El tiempo de contacto entre microorganismos y células epiteliales se determina con anterioridad, así como todas las variables que se introducen antes, durante y después del tiempo de adherencia. Las bacterias que no se han adherido a las células epiteliales, se eliminan posteriormente mediante varios métodos como filtración, lavado o centrifugaciones diferenciales repetidas.

Mediante esta técnica se han obtenido resultados fiables, al introducir diferentes variantes en el sistema, ya sean cambios en las condiciones de incubación o la introducción de sustancias específicas, implicadas en el proceso de adherencia. Como contrapartida posee el inconveniente de obviar una serie de defensas fisiológicas que se encuentran en la superficie de las células infectadas y que intervienen de forma importante en este proceso (6).

Para seleccionar un modelo que estudie el mecanismo de adherencia de un determinado microorganismo, necesitamos cumplir dos criterios. En primer lugar que dicha prueba permita la cuantificación de la adherencia y en segundo lugar que el sistema sea flexible a la introducción de diversas variables (88).

En los primeros estudios de adherencia, se utilizaron células epiteliales humanas descamadas (urinarias, bucales, vaginales), pero poseían una serie de inconvenientes. Constituyen una población heterogénea con respecto al número de propiedades que son potencialmente relevantes en la adherencia bacteriana, incluyendo la pérdida de viabilidad celular. Se encuentran contaminadas por detritus, así como por levaduras y bacterias comensales, que ocupan los receptores celulares, interfiriendo la lectura de los resultados. Estas células tienen absorbidas en su superficie inmunoglobulinas y otros componentes presentes en las secreciones de saliva, vagina o vehiculadas por la orina. Y por último existe una gran variabilidad en las mismas debido a la edad del donante, fase del ciclo menstrual, medidas contraceptivas y antecedentes de infecciones bacterianas o virales.

Algunos de estos factores que introducen una gran

distorsión entre distintos ensayos, se trataron de obviar observando la flora acompañante al microscopio óptico, así como la utilización de un donante único (84). Como contrapartida queda limitado el número de estudios así como la introducción de diversas variables, al disponer de un número relativamente bajo de células epiteliales.

Por todos estos inconvenientes, se comenzó a utilizar como sustrato del modelo de adherencia, células epiteliales procedentes de una línea celular continua. Esta población, en comparación con las células exfoliadas, es más homogénea, se encuentran libres de contaminación sobreañadida y los microorganismos se adhieren únicamente a la superficie en contacto con el lumen. Además las bacterias no adherentes se eliminan fácilmente mediante lavados sucesivos. Por lo tanto los cultivos celulares permiten estudios más amplios y sistematizados, aunque no debemos olvidar que la superficie de estas células puede estar alterada "in vitro", como consecuencia de la transformación o multiplicidad de pases celulares. No pudiendo asumir que retengan receptores funcionalmente análogos a los expresados por sus células madre "in vivo".

Este inconveniente se intentó solventar utilizando tejido fresco u órganos de transplante. Estos asemejan el microambiente complejo de la mucosa del huésped intacto, pero en su defecto poseen una mala aclimatación a las condiciones del laboratorio y no son tan idóneos para la manipulación experimental, como las células descamadas o los cultivos celulares (84).

Al comienzo de este estudio, empleamos células de boca exfoliadas procedentes de donantes sanos, pero nos encontramos con el inconveniente de la persistencia de cierta colonización por microorganismos de la flora

comensal de la cavidad oral, después de realizar lavados sucesivos mediante centrifugación. Sobreañadido a esto, el número de células obtenido por raspado de la mucosa bucal no era suficiente para introducir distintas modificaciones en el sistema. Estos impedimentos, unidos a la crítica de este procedimiento por diversos autores, nos condujo a utilizar una línea celular continúa, constituida por células epiteliales procedentes de carcinoma epidermoide de nasofaringe humano, en todo el estudio.

La cuantificación de la adherencia debe reflejar la proporción de células bacterianas de una población que son capaces de unirse a las células. En cualquiera de los modelos de adherencia anteriormente descritos, los resultados se pueden obtener mediante un método visual, radiométrico o por recuento de colonias después de la siembra en agar.

En la técnica de lectura visual, podemos valorar la adherencia de dos formas. Por un lado contabilizando la proporción de células epiteliales con un mínimo de bacterias adheridas, lo cual constituye una medida de la receptividad del sustrato y/o la tendencia del microorganismo a coadherirse. O evaluar la media aritmética de bacterias adheridas al total de células epiteliales, con lo cual obtenemos una estimación más exacta de la adherencia relativa de la población bacteriana al sustrato (88).

El método de lectura radiométrico, en comparación con el método visual, tiene las ventajas de una mayor comodidad y rapidez en la interpretación de los resultados, perdiendo además la subjetividad implícita al observador. Pero como contrapartida posee la desventaja de requerir un laboratorio preparado para la manipulación de material radioactivo, la disponibilidad de un contador de centelleo para realizar la lectura de

los viales y su mayor coste económico. Añadido a esto, no podemos visualizar morfológicamente la disposición y morfología de las bacterias después de que se ha producido su adherencia a las células epiteliales.

En nuestro estudio, en relación con el método de evaluación de los resultados, preferimos como estadio inicial, la técnica visual. Y en segundo término, una vez comprobado que el método era factible, continuar con el método radiométrico, para comparar los resultados obtenidos y ampliar el estudio mediante la introducción de nuevas variables.

Diversos estudios se han desarrollado con el objetivo de comprender mejor como interfieren los antimicrobianos en dosis subinhibitorias en la adherencia bacteriana. Se han ofrecido cuatro posibles mecanismos de actuación. El agente podría alterar la morfología del microorganismo, lo cual conllevaría una modificación espacial en su aproximación a los receptores localizados en la superficie celular. Otro efecto sería la pérdida de las estructuras adhesivas de la superficie bacteriana. O podría inducir la formación de adhesinas funcionalmente deficientes. Y por último por supresión de la síntesis o secreción de adhesinas de superficie (89).

Por otro lado, distintos autores han postulado que los antimicrobianos seleccionados por su mecanismo de acción, teóricamente ayudarían a determinar la expresión, estructura y función de componentes de superficie importantes, implicados en la adherencia a mucosas humanas (46,55).

Así elegimos en este trabajo, un aminoglucósido y una penema, junto con una cefalosporina de tercera generación específicamente activa frente a este

microorganismo, que además de tener diferente mecanismo de acción, constituyen tratamientos empíricos estandar en las infecciones producidas por P.aeruginosa.

Amicacina, como todos los aminoglucósidos, actúa a nivel del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis protéica. Este antimicrobiano provoca la lectura errónea del codon, bloqueando de esta manera el complejo de iniciación; además inhibe la translocación, al estabilizar la unión entre el peptidil ARN_t y el lugar A del ribosoma (90). Imipenema y ceftazidima son antimicrobianos betalactámicos, que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Su mecanismo de acción es interrumpir la transpeptidación, con lo cual no se produce la unión de los distintos componentes del peptidoglicano. Estos antimicrobianos se unen, inactivando dianas determinadas, que se encuentran situadas en la superficie interna de la membrana celular bacteriana, proteínas fijadoras de penicilina (PBPs). Estas PBPs son enzimas que intervienen en las últimas etapas de ensamblaje de la pared celular. Cada antimicrobiano tiene distinta afinidad por cada PBP y dependiendo a cual de ellas se una, tendrá diferentes efectos. Además su unión a las PBPs, provoca la inactivación de inhibidores endógenos de las autolisinas bacterianas, con lo cual éstas se liberan, provocando roturas de las uniones covalentes de la pared celular (91).

También introdujimos en el estudio tres fluorquinolonas, debido a su buena actividad "in vitro" sobre este patógeno oportunista (92,93) y a los buenos resultados obtenidos en el tratamiento de algunas de sus infecciones, especialmente pulmonares en pacientes con fibrosis quística. Los antimicrobianos quinoleínicos actúan sobre las topoisomerasas o girasas del ADN, específicamente en la subunidad α de la topoisomerasa

II y II'. De esta manera una vez producidos cortes en determinados segmentos del ADN de una sola banda, al estar inhibida dicha enzima, no se puede llevar a cabo la reparación. Además al inhibir la topoisomerasa II', no se produciría el enrollamiento del ADN, con lo cual éste no tendría cabida física en la célula (98,99).

Durante muchos años se ha asumido que los antimicrobianos producen la curación de las infecciones cuando se alcanzan niveles superiores a la CMI o CMB. Pero cada vez, son más los datos aportados a favor del papel que juegan las concentraciones subinhibitorias de distintos antimicrobianos en la resolución de las enfermedades infecciosas. Entre los efectos producidos se incluyen alteraciones en la bioquímica y tasa de multiplicación, ultraestructura y morfología bacteriana. También se ha estudiado su intervención en la modulación de la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos (40,100) y en el proceso de adherencia bacteriana (43).

En nuestro trabajo, evaluamos la interferencia de las concentraciones subinhibitorias de seis antimicrobianos en la adherencia de P.aeruginosa a células Kb.

Al efectuar el análisis del método visual, cuando preincubamos las bacterias durante 4 horas con concentraciones subinhibitorias de seis antimicrobianos, observamos una inhibición significativa de la adherencia de P.aeruginosa a células Kb. Este efecto no fué debido a la muerte bacteriana, ya que se utilizaron concentraciones inferiores a la CMI, y en el caso de los antimicrobianos que produjeron alteraciones morfológicas como formas filamentosas, los efectos inhibitorios persistieron al reducir la dosis de antibiótico, siendo en este caso, formas bacterianas de morfología aparentemente normal al microscopio óptico.

Con todos los antimicrobianos ensayados, se observó un efecto dosis dependiente, alcanzándose los mayores valores de inhibición con la concentración más alta. Visualmente no se detectó ninguna agrupación especial de P.aeruginosa en su adherencia a las células epiteliales, tan solo que el mayor número de bacterias se encontró unido a la periferia, en menoscabo del cuerpo celular. Además se observó al utilizar la concentración más elevada del antimicrobiano que las bacterias con formas anómalas eran capaces de adherirse en menor proporción, que aquellas de apariencia normal.

Ciprofloxacina fué el antimicrobiano que produjo los mayores valores de inhibición de la adherencia (82%). Este resultado es coincidente con el efecto antiadhesivo provocado por esta quinolona en la adherencia de E.coli a células uroepiteliales humanas, con valores de inhibición del 40-80 %, en la mayoría de las cepas (101,102).

Imipenema y ceftazidima mostraron en nuestras cepas valores de inhibición de la adherencia del 81 y 72 % respectivamente. Resultados similares fueron también observados por MONGIO y cols. (103), cuando sometieron cepas de E.coli al pretratamiento con concentraciones subinhibitorias de CZ e IME. Aunque en este estudio CZ tuvo un efecto más marcado que IME.

Diversos estudios han confirmado el efecto antiadhesivo que tiene el tratamiento de P.aeruginosa con concentraciones subinhibitorias de CZ. Este hallazgo fué observado por LIANOU y cols. (41), al estudiar la adherencia de diversos microorganismos a células descamadas de la boca, obteniendo porcentajes de inhibición de la adherencia del 60 %. Estos resultados fueron posteriormente confirmados por

RICHETTI y cols. (104), al investigar la adherencia de P.aeruginosa a células orales y traqueales. También VISHWANATH y cols. (79) estudiando la adherencia de este microorganismo a mucina traqueobronquial, observaron que en el 40 % de las cepas no mucoides tratadas con CZ, se produjo una inhibición de la adherencia superior al 50 %.

Las otras dos fluorquinolonas, ofloxacina y norfloxacina, tuvieron un comportamiento similar, con porcentajes de inhibición de la adherencia del 68 y 63% respectivamente. El efecto antiadhesivo de NF, también ha sido observado sobre E.coli (103), así el pretratamiento de este microorganismo con concentraciones subinhibitorias de este antimicrobiano, provoca una reducción significativa de su adherencia a células uroepiteliales; coincidimos con estos autores en que el efecto fué cuantitativamente menor al observado con CZ.

Por último, el aminoglucósido, amicacina, provocó comparativamente el menor porcentaje de inhibición de la adherencia, sin embargo se obtuvieron valores de hasta el 52 %. Nuestros resultados no están de acuerdo con los de otros autores, como RICHETTI y cols. (104), que encontraron una mayor eficacia de netilmicina y amicacina sobre los betalactámicos en la inhibición de la adherencia de P.aeruginosa a células orales y traqueales. Sin embargo en otra experiencia GEERS y cols. (105) detectaron que el pretratamiento de este microorganismo con concentraciones subinhibitorias de tobramicina y gentamicina, no produjo alteraciones de la adherencia a cultivos de células traqueales de hamster, en comparación con las bacterias no sometidas a ningún tratamiento. Resultados similares fueron obtenidos por VISHWANATH y cols. (79), ya que cuando utilizaron bacterias pretratadas con concentraciones

subinhibitorias de tobramicina, el porcentaje de adherencia a mucina traqueobronquial, comparado con controles, no varió significativamente.

Cuando comparamos los valores obtenidos al realizar el tratamiento durante 4 y 18 horas, con concentraciones subinhibitorias de los distintos antimicrobianos, observamos que la inhibición de la adherencia se mantuvo en cifras similares, excepto con IME y CP, cuyos porcentajes de inhibición oscilaron desde 81 y 82 % a las 4 horas de tratamiento, al 40 y 68 % a las 18 horas respectivamente ($p \leq 0.001$). Por el contrario se observó que CZ aumentó significativamente el porcentaje de inhibición de la adherencia desde el 72 al 82 % (4 y 18 horas respectivamente). No encontramos ninguna explicación a este fenómeno, ni detectamos en la literatura estudios que evalúen la influencia del tiempo de pretratamiento bacteriano en la adherencia.

Los resultados obtenidos con el método visual, se confirmaron cuando la técnica se realizó mediante el marcaje radioactivo de las bacterias. Hay que reseñar que en nuestro estudio, al utilizar el marcaje radioactivo de bacterias sometidas al tratamiento con antimicrobianos, observamos discrepancias al valorar dos parámetros. Así cuando consideramos la radioactividad bacteriana adherida a las células epiteliales, el valor de adherencia fué mayor que cuando analizamos el número de unidades formadoras de colonias que corresponden realmente a la emisión radioactiva. Ello se traduce en que los valores de inhibición de la adherencia bacteriana son más acusados cuando consideramos el número de UFC adheridas a las células epiteliales.

En todos los casos se encontró una inhibición de

la adherencia por encima del 50 %, con respecto al control sin antimicrobiano. Sin embargo en este caso, OF fué el antimicrobiano que tuvo mayor eficacia en su efecto antiadhesivo (96 %), seguido por CZ, CP y NF (91, 78 y 73 % respectivamente). De menor cuantía fué la inhibición de AMC e IME (62 y 56 %). En todos los antimicrobianos con excepción de norfloxacin, se encontraron valores estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$).

Por consiguiente, tanto el método visual como el radiométrico, nos ofrecen resultados similares, apoyando la influencia de las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos en la inhibición de la adherencia de P.aeruginosa. Las discrepancias cuantitativas entre ambos métodos podrían ser inherentes a la utilización de dos métodos, cuya base de análisis es diferente. Así en la lectura visual contabilizamos el número de bacterias adheridas a 40 células, mientras que en el método radiométrico evaluamos el número de bacterias radioactivas adheridas a todas las células epiteliales. Otro dato a tener en cuenta es la subjetividad de interpretación asociado al método visual, factor que queda excluido en el método radiométrico.

Para intentar evaluar si la dismunición de la adherencia de P.aeruginosa, mediada por concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos, era debida a una alteración de la hidrofobicidad de superficie bacteriana, realizamos el pretratamiento de las bacterias durante 4 y 18 horas, procediendo a continuación a la medición de la hidrofobicidad de superficie. En ningún caso, los antimicrobianos modificaron significativamente el porcentaje de hidrofobicidad, en comparación con las bacterias no sometidas a tratamiento. Con nuestros resultados

podríamos postular que el mecanismo de interferencia de los antimicrobianos, no se encuentra mediado por alteraciones de la hidrofobicidad de superficie, en estas cepas de P.aeruginosa y con estos antimicrobianos.

Sin embargo KLEIN y cols. (106) observaron un aumento de la hidrofobicidad de superficie, cuando se sometió a cepas de E.coli al pretratamiento con antimicrobianos betalactámicos, mientras que cuando se utilizó fosfomicina se produjo una reducción de la misma. A pesar de ello, no lograron establecer una correlación entre cambios de hidrofobicidad de superficie bacteriana y alteraciones cuantitativas de la adherencia de E.coli a hematíes humanos. Además no se produjo una reducción significativa de la carga negativa de ninguna de las cepas mediada por antibióticos, que constituye otro de los factores implicados en la adherencia inespecífica. Por todo ello concluyen que los antimicrobianos probados tienen una influencia indudable sobre la adherencia bacteriana, pero los mecanismos involucrados permanecen desconocidos. A conclusiones similares llegaron FERREIROS y cols. (56) al estudiar la hidrofobicidad de superficie y la adherencia de Neisseria meningitidis a células descamadas de la boca, así como la interferencia de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos en estos dos procesos. Sin embargo TYLEWSKA y cols. (58) demostraron que la reducción de la adherencia de Streptococcus pyogenes conseguida por rifampicina y penicilina, se correlacionaba con una disminución de la hidrofobicidad de superficie bacteriana.

Una vez demostrado que las concentraciones subinhibitorias de estos antimicrobianos producen una inhibición significativa de la adherencia, tratamos de establecer si la preincubación de las células

epiteliales con las mismas concentraciones antibióticas, producía alguna modificación en sus receptores celulares, que se tradujeran en una alteración cuantitativa de la adherencia de P.aeruginosa. Los resultados no mostraron una apreciable reducción de la adherencia y tan solo las tres fluorquinolonas empleadas marcaron una ligera inhibición, no siendo estadísticamente significativa (27 %). Sin embargo GILDSFORD y cols. (107) al estudiar la adherencia de una cepa de Haemophilus influenzae tipo b a células orales descamadas, observaron que la preincubación de las células con la mitad de la CMI de ampicilina, clindamicina, cloranfenicol, lincomicina y trimetoprim-sulfametoxazol durante treinta minutos, producía una reducción de la capacidad de adherencia de las bacterias. Estos autores sugieren que los antimicrobianos bloquean los receptores celulares, con lo cual los microorganismos no encuentran dianas libres para su unión a las células.

En último lugar tratamos de averiguar si la presencia de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos durante el período de contacto entre P.aeruginosa y células epiteliales, produce algún tipo de modificación. Para ello en el momento de poner en contacto bacterias y células, se adicionaron los distintos antimicrobianos en concentraciones subinhibitorias. No encontramos en ningún caso, una inhibición de la adherencia significativa, siendo los máximos valores debidos a las quinolonas (17 %).

Analizando todos los datos obtenidos, en nuestras cepas de P.aeruginosa no hemos detectado correlación entre la producción de sustancia mucoide e hidrofobicidad de superficie de las cepas. Tampoco encontramos interrelación significativa entre adherencia e hidrofobicidad. Lo que nos hace postular que la

hidrofobicidad de superficie no se puede considerar como un factor relevante en la determinación de la adherencia bacteriana, jugando un papel más trascendente cuando se une a otros factores como la carga de superficie bacteriana. En nuestras cepas y con los seis antimicrobianos ensayados, observamos una reducción significativa de la adherencia. El mecanismo involucrado no parece estar mediado por alteraciones de la hidrofobicidad de superficie bacteriana.

Las implicaciones clínicas de estos resultados serían importantes. De esta manera, cuando realizamos profilaxis antimicrobiana, los niveles antibióticos alcanzados por ejemplo en mucosa traqueobronquial se encuentran por debajo de la CMI. Pero aunque estos niveles son subinhibitorios, hipotéticamente se produciría una disminución de la capacidad de adherencia de P.aeruginosa, previniendo la colonización de estas células. Como consecuencia evitaríamos uno de los factores predisponentes a la neumonía nosocomial, ya que en diversos estudios se ha comprobado que la colonización del árbol respiratorio superior por bacilos Gram negativos, constituye el reservorio de microorganismos, los cuales mediante un mecanismo de microaspiración llegan a bronquios y bronquiolos, produciendo el cuadro bronconeumónico (79). A todo ello contribuiría la mayor susceptibilidad de estas bacterias a la fagocitosis, mediada asimismo por bajos niveles de antimicrobianos presentes.

En otros casos, empleando dosis bajas de antimicrobianos y en base al mismo mecanismo de actuación, se podría prevenir la colonización periuretral y por consiguiente las recurrencias en pacientes con infecciones crónicas del tracto urinario (101).

En otro aspecto, en determinados momentos de un tratamiento antimicrobiano, se alcanzan en mucosas niveles inferiores a la CMI, que aunque no son capaces de matar las bacterias, si impedirían su adherencia a células y con ello su invasión. Frente a estas hipótesis teóricas en base a experiencias "in vitro", se encuentran reflejados en la literatura algunos estudios que intentan demostrar "in vivo" estas teorías (108). FRANCILOI y cols. (63) realizaron un modelo experimental de endocarditis estreptocócica en ratas, que fué eficazmente prevenida con una dosis de penicilina que produjo niveles en todo momento inferiores a la CMI. La explicación a este fenómeno fué dada por DRAKE y cols. (62) que demostraron en un modelo animal de endocarditis trombótica, que las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos tienen como resultado la disminución de la adherencia y por consiguiente de la infectividad bacteriana.

En estudios en humanos, se ha descrito que bajas dosis de ampicilina, que se corresponden con niveles de antibióticos en torno a una octava parte de la CMI, producen curación bacteriológica en pacientes con infección del tracto urinario sintomáticas (61). También se ha descrito en otros trabajos el éxito terapéutico del tratamiento con dosis aparentemente correctas de aminoglucósidos de infecciones graves por Enterobacteriaceae y Pseudomonas spp, en los cuales cuando se determinó los niveles séricos, se detectó concentraciones menores de 1/8 CMI en un 17-33 % de los pacientes. En este grupo la mortalidad fué similar al grupo con concentraciones antibióticas superiores a esta cifra. Además no se encontraron evidencias de toxicidad renal debido al tratamiento con tobramicina o gentamicina (57).

A la vista de todos estos hallazgos, teóricamente

la utilización de dosis bajas de antimicrobianos producirían un menor índice de toxicidad, menor alteración de la flora normal del organismo y adicionalmente se reduciría el costo de los tratamientos.

CONCLUSIONES

1. Las cinco cepas de P.aeruginosa utilizadas en nuestro estudio, no mostraron la producción de sustancia mucoide.
2. P.aeruginosa expresó valores de hidrofobicidad de superficie variable, desde un 60 % para la cepa más hidrófoba, hasta un 10 % para la cepa más hidrófila.
3. No hubo diferencias significativas entre los valores cuantitativos de la hidrofobicidad de superficie observados cuando las bacterias se incubaron durante 4 o 18 horas, previamente a la realización de la prueba.
4. No se encontró relación entre hidrofobicidad de superficie bacteriana y procedencia de las cepas (sangre y orina).

5. No se produjeron cambios significativos en la hidrofobicidad de superficie bacteriana, cuando P.aeruginosa se preincubó durante 4 o 18 horas con concentraciones subinhibitorias de amicacina, imipenema, ceftazidima, ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina.
6. No hubo asociación entre mayor adherencia bacteriana a células epiteliales y mayor porcentaje de hidrofobicidad de superficie.
7. Las concentraciones subinhibitorias de los diferentes antimicrobianos produjeron una disminución significativa de la capacidad de adherencia de P.aeruginosa a células epiteliales de un cultivo celular.
8. En el método visual, la preincubación de las bacterias durante 4 horas con concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos produjo una marcada inhibición del porcentaje de adherencia bacteriana, siendo ciprofloxacina e imipenema los antimicrobianos más efectivos, con valores de 82 y 81 % respectivamente. Seguidos por ceftazidima (72 %), ofloxacina y norfloxacina (68 y 63 % respectivamente) y en último lugar amicacina (52 %).
9. Cuando comparamos los valores obtenidos al realizar el tratamiento bacteriano durante 4 y 18 horas, con concentraciones subinhibitorias de los distintos antimicrobianos, la inhibición de la adherencia bacteriana se mantuvo en cifras similares, excepto con imipenema y ciprofloxacina, que tuvieron un efecto antiadherente significativamente más marcado en el período de tratamiento más corto. Por el contrario ceftazidima, aumentó

el porcentaje de inhibición cuando el período de tratamiento fué mayor (18 horas).

10. Con los antimicrobianos que produjeron formas bacterianas morfológicamente anormales, se observó que mayoritariamente los microorganismos aparentemente normales fueron capaces de unirse a las células epiteliales con mayor eficacia que las formas filamentosas.
11. En el método radiométrico, ofloxacina fué el antimicrobiano más eficaz al reducir la adherencia de P.aeruginosa en el 96 %, seguido por ceftazidima, ciprofloxacina y norfloxacina (91, 78 y 73 % respectivamente). En menor cuantía fué la inhibición de la adherencia provocada por amicacina e imipenema (62 y 56 % respectivamente).
12. La interferencia de los antimicrobianos en la adherencia bacteriana no estuvo mediada por cambios de su hidrofobicidad de superficie.
13. La preincubación de las células epiteliales con concentraciones suinhibitorias de antimicrobianos, no produjo alteraciones cuantitativas de la adherencia de P.aeruginosa.
14. La presencia de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos durante el tiempo de adherencia, no alteró la proporción de bacterias adheridas a las células epiteliales.

BIBLIOGRAFIA

1. GESSARD, C: Sur les colorations bleue et verte des linges à pausements. CR. Sceances Acad. Sci. Serie D. 94: 536-538, 1882.
2. MORRISON, Jr. A.J., WENZEL, R.P.: Epidemiology of infections due to Pseudomonas aeruginosa. Rev. Infect. Dis. 6 (Suppl. 3): S627-S642, 1984.
3. FALGUERA, M., DORCA, J., RUFÍ, G., VERDAGUER, R., BOADA, J., GUDIOL, F.: Neumonía nosocomial por Pseudomonas aeruginosa. Revisión de 26 casos. En Comunicación al II Congreso SEIMC. Palma de Mallorca. 24/6, 1986.
4. MONGE, V., LOPEZ-ABENTE, G., HIDALGO, O., GONZALEZ, L., VELAZQUEZ, L., ROMERO, C.: Factores de riesgo en las infecciones urinarias hospitalarias. Estudio prospectivo. Med. Clin. 86: 7-9, 1986.

5. Grupo de estudio de la bacteriemia (coordinador: MARTINEZ LUENGAS, F.): Bacteriemia en seis hospitales españoles. Med. Clin. 86: 221-232, 1986.
6. OFEK, I., BEACHEY, E.H.: Bacterial adherence, In Stollerman, G.H. (ed.). Advances in Internal Medicine. Year Book Medical Publishers. 25: 503-532, 1980.
7. SPEERT, D.P., Loh, B.A., CABRAL, D.A., SALIT, I.E.: Nonopsonic phagocytosis of nonmucoid Pseudomonas aeruginosa by human neutrophils and monocyte derived macrophages is correlated with bacterial piliation and hidrophobicity. Infect. Immun. 53: 207-212, 1986.
8. PRUZZO, C., DAINELLI, B., RICETTI, M.: Piliated Bacteroides fragilis strains adhere to epithelial cells and are more sensitive to phagocytosis by human neutrophils than non piliated strains. Infect. Immun. 43: 189-194, 1984.
9. BELL, G.I.: Models for the specific adhesion of cells to cells. Science 200: 618-627, 1978.
10. DERJAGUIN, B.V., LANDAU, L.: Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. Acta Physicochim URSS 14: 633-662, 1941.
11. VERWEY, E.J.W., OVERBEEK, J.T.G.: Theory of the stability of lyophobic colloids; the interactions of sol particles having an electric double layer. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1948.

12. MAGNUSSON, K.E.: Hydrophobic interaction - a mechanism of bacterial binding. Scand. J. Infect. Dis. Suppl 33: 32-36, 1982.
13. MAGNUSSON, K.E., DAVIES, J., GRUNDSTROM, T., KIHLMSTROM, E., NORMARK, S.: Surface change and hydrophobicity of Salmonella, Escherichia coli and Gonococci in relation to their tendency to associate with animal cells. Scand. J. Infect. Dis. Suppl 24: 135-140, 1979.
14. PROCTOR, R.A.: Fibronectin: a brief overview of its structure, function and physiology. Rev. Infect. Dis. 9 Suppl 4: S317-S321, 1987.
15. KULCZYCKI, L.L., MURPHY, T.M., BELLANTI, J.A.: Pseudomonas colonization in cystic fibrosis. J.A.M.A. 240: 30-34, 1978.
16. SCHWARZMANN, S., BORING, J.R. III: Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun 3: 762-767, 1971.
17. GOWAN, J.R.W.: Mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa: The influence of culture media on the stability of mucus production. J. Med. Microbiol. 8: 513-522, 1975.
18. GOWAN, J.R.W., FYFE, J.A.M.: Mucoid Pseudomonas aeruginosa y cistic fibrosis: resistance of the mucoid from to carbenicillin, flucoxacillin and tobramycin and the isolation of the mucoid variants. J. Antimicrob. Chemother. 4: 233-240, 1978.
19. BAKER, N.R., MARCUS, H.: Adherence of clinical

- isolates of Pseudomonas aeruginosa to hamster tracheal epithelium in vitro. Curr. Microbiol. 7: 35-40, 1982.
20. McEACHRAN, D.W., IRVIN, R.T.: Adhesion of Pseudomonas aeruginosa to human buccal epithelial cells: evidence for two classes of receptors. Can. J. Microbiol. 31: 563-569, 1985.
 21. RAMPHAL, R., PIER, G.B.: Role of Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. Infect. Immun. 47: 1-4, 1985.
 22. RAMPHAL, R., GUAY, C., PIER, G.B.: Pseudomonas aeruginosa adhesins for tracheobronchial mucin. Infect. Immun. 55: 600-603, 1987.
 23. DOIG, P., SMITH, N.R., TODD, T., IRVIN, R.T.: Characterization of the binding of Pseudomonas aeruginosa alginate to human epithelial cells. Infect. Immun. 55: 1517-1522, 1987.
 24. WOODS, D.E., STRAUS, D.C., JOHANSON, Jr. W.G., BERRY, V.K., BASS, J.A.: Role of pili in adherence of Pseudomonas aeruginosa to mammalian buccal epithelial cells. Infect. Immun. 29: 1146-1151, 1980.
 25. RAMPHAL, R., SADOFF, J.C., PYLE, M., SILIPIGNI, J.D.: Role of pili in the adherence of Pseudomonas aeruginosa to injured tracheal epithelium. Infect. Immun. 44: 38-40, 1984.
 26. SATO, H., OKINAGA, K.: Role of pili in the adherence of Pseudomonas aeruginosa to mouse epidermal cells. Infect. Immun. 55: 1774-1778, 1987.

27. WATTS, T.H., SASTRY, P.A, HODGES, R.S., PARANCHYCH, W.: Mapping of the antigenic determinants of Pseudomonas aeruginosa PAK polar pili. Infect. Immun. 42: 113-121, 1983.
28. VISHWANATH, S., RAMPHAL, R.: Adherence of Pseudomonas aeruginosa to human tracheobronchial mucin. Infect. Immun. 45: 197-202, 1984.
29. FRANKLIN, A.L., TODD, T., GURMAN, G., BLACK, D., MANKINEM-IRVIN, P.M., IRVIN, R.T.: Adherence of Pseudomonas aeruginosa to cilia of human tracheal epithelial cells. Infect. Immun. 55: 1523-1525, 1987.
30. VISHWANATH, S., RAMPHAL, R.: Tracheobronchial mucin receptor for Pseudomonas aeruginosa: predominance of aminosugars in binding sites. Infect. Immun. 48: 331-335, 1985.
31. HAZLETT, L.D., MOON, M., BERK, R.S.: In vivo identification of sialic acid as the ocular receptor for Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 51: 687-689, 1986.
32. RAMPHAL, R., PYLE, M.: Evidence for mucins and sialic acid as receptors for Pseudomonas aeruginosa in the lower respiratory tract. Infect. Immun. 41: 339-344, 1983.
33. RAMPHAL, R., PYLE; M.: Further characterization of the tracheal receptor for Pseudomonas aeruginosa. Eur. J. Clin. Microbiol. 4: 160-162, 1985.
34. BENTH, J., KO, H.L., UHLENBRUCK, G., PULVERER, G.: Lectin mediated bacterial adhesion to human tissue. Eur. J. Clin. Microbiol. 6: 591-593, 1987.

35. SOBESLAVSKY, O., PRESCOTT, B., CHANOCK, R.M.: Adsorption of Mycoplasma pneumoniae to neuraminic acid receptors of various cells and possible role in virulence. J. Bacteriol. 96: 695-705, 1968.
36. SWEET, C., SMITH, H.: Pathogenicity of influenza virus. Microbiol. Rev. 44: 303-330, 1980.
37. WOODS, D.E., BRYAN, L.E.: Studies on the ability of alginate to act as a protective immunogen against infection with Pseudomonas aeruginosa in animals. J. Infect. Dis. 15: 581-588, 1985.
38. GEERS, T.A., BAKER; N.R.: The effect of sublethal levels of antibiotics on the pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa for tracheal tissue. J. Antimicrob. Chemother. 19: 569-578, 1987.
39. BASSARIS, H.P., LIANOU, P.E, PAPA VASSILIOU, J.T.: Interaction of sub-MIC of clindamycin and Escherichia coli: effects on adhesion and polymorphonuclear leukocyte function. J. Antimicrob. Chemother. 13: 361-367, 1984.
40. CUFFINI, A.M., CARLONE, N.A., XERRI, L., PIZZOGLIO, M.F.: Synergy of ceftazidime and human macrophages on phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. J. Antimicrob. Chemother. 20: 261-271, 1987.
41. LIANON, P.E., BASSARIS, H.P., VOTTA; E.G., PAPA VASSILIOU, J.Th.: Interaction of subinhibitory concentrations of ceftazidime and Gram negative bacteria: effects on adhesion and polymorphonuclear leukocyte function. In Proceedings of the IV Mediterranean Congress of Chemotherapy. Daikos, G.K., Giamarellou, H. (ed). Rhodos. 571-572, 1984.

42. MILATOVIC, D.: Influence of subinhibitory concentrations of antibiotics on opsonization and phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa by human polymorphonuclear leukocytes. Eur. J. Clin. Microbiol. 3: 288-293, 1984.
43. SVANBORD-EDEN, C., SANDBERG, T., AHLSTEDT, K.: Decrease in adhesion of Escherichia coli to human urinary tract epithelial cells in vitro by subinhibitory concentrations of ampicillin. Infection 6 (Suppl. 1): 121-124, 1978.
44. EISENSTEIN, B.I., OFEK, I., BEACHEY, E.H.: Interference with mannose binding and epithelial cell adherence of Escherichia coli by sublethal concentrations of streptomycin. J. Clin. Invest. 63: 1219-1228, 1979.
45. VOSBECK, K., HANDSCHIN, H., MENGE, E.B., ZAK, O: Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on adhesiveness of Escherichia coli in vitro. Rev. Infect. Dis. 1: 845-851, 1979.
46. OFEK, I., BEACHEY, E.H., EISENSTEIN, B.I., ALKAN, M.L., SHARON, N.: Suppression of bacterial adherence by subminimal inhibitory concentrations of betalactam and aminoglycoside antibiotics. Rev. Infect. Dis. 1: 832-837, 1979.
47. VOSBECK, K., METT, H., HUBER, U., BOHN, J., PETIGNAT, M.: Effects of low concentrations of antibiotics on Escherichia coli adhesion. Antimicrob. Agents. Chemother. 21: 864-869, 1982.
48. VAISSANEN, V., LOUHATMAA, K., KORHONEN; T.K.: Effects of sublethal concentrations of antimicrobial agents on the hemagglutination,

- adhesion and ultrastructure of pyelonephritogenic Escherichia coli strains. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 22: 120-127, 1982.
49. STENQVIST, K., SANDBERG, T., AHLSTEDT; S., KORHONEN, T.K., SVANBORG-EDEN, C.: Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics and antibodies on the adherence of Escherichia coli to human uroepithelial cells in vivo. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl. 33)*: 104-107, 1982.
50. DESNOTTES, J.F., DIALLO, N., SANTONJA, R.: Effect of subminimal inhibitory concentrations of pefloxacin on the hemagglutination and adhesion of pyelonephritogenic Escherichia coli strains. In *Proceedings of the IV Mediterranean Congress of Chemotherapy*. Daikos, G.K, Giamarellou, H. (Ed.). Rhodos, 574-576, 1984.
51. CARBONE, M., FAVA, C., FERA, M.T., FOCA, A.: Ceftriaxone and moxalactam subinhibitory concentrations modify the Escherichia coli adhesivity to human urinary tract epithelial cells. In *Abstract of the 2nd Congress of Clinical Microbiology*, Brighton, 19/3, 1985.
52. DESNOTTES, J.F., DIALLO, N., SANTONJA, R., MORET, G.: Effect of spiramycin on the adherence of Gram positive cocci to human cells. In *Abstracts of the Vth Mediterranean Congress of Chemotherapy*, Cairo, P-272, 1986.
53. ALKAN, M.L., BEACHEY, E.H.: Excretion of lipoteichoic acid by group A streptococci: influence of penicillin on excretion and loss of ability to adhere to human oral epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 61: 671-677, 1978.

54. SANDBERG, T., STENQVIST, K., SVANBORG-EDERN, C: Effects of subminimal inhibitory concentrations of ampicillin, chloramphenicol and nitrofurantoin on the attachment of Escherichia coli to human uroepithelial cells in vitro. Rev. Infect. Dis. 1: 838-844, 1979.
55. STEPHENS, D.S., KREBS, J.W., MCGEE, Z.A.: Loss of pili and decreased attachment to human cells by Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae exposed to subinhibitory concentrations of antibiotics. Infect. Immun. 46: 507-513, 1984.
56. BEACHEY, E.H., EISENSTEIN, B.I., OFEK, I.: Sublethal concentrations of antibiotics and bacterial adhesion. In Ciba Foundation Symposium., Elliot, K., O'Connor, M., Whelan, J. (Ed), Adhesion and microorganism pathogenicity, Pitman Medical Publishers, London, 80: 288-305, 1981.
57. CHOPRA; I., HACKER; K.: Inhibition of K88 mediated adhesion of Escherichia coli to mammalian receptors by antibiotics that affect bacterial protein synthesis. J. Antimicrob. Chemother. 18: 441-451, 1986.
58. TYLEWSKA; S.K., WADSTROM, T.: The effect of subinhibitory concentrations of penicillin and rifampicin on bacterial cell surface hydrophobicity and on binding to pharyngeal epithelial cells. J. Antimicrob. Chemother. 6: 292-294, 1980.
59. CRIADO, M.T., FERREIROS, C.M., SAINZ, V., SUAREZ, B., CARBALLO, J., DEL RIO, M.C.: Effect of subinhibitory concentrations of ceftazidime on several pathogenic properties of Neisseria meningitidis strains. In Abstracts of the 2nd

European Congress of Clinical Microbiology,
Brighton, 19/4, 1985.

60. FERREIROS, C.M., CRIADO, M.T., SAINZ, V., CARBALLO, J., DEL RIO, C., SUAREZ, 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. 137 B: 37-45, 1986.
61. REDJEB, S.B., SLIM, A., HORCHANI, A., ZMERLI, S., BOUJNAH, A., LORIAN, V.: Effects of ten milligrams of ampicillin per day on urinary tract infections. Antimicrob. Agents Chemother. 22: 1084-1086, 1982.
62. DRAKE; T.A., SCHELD, W.M., SANDE, M.A.: Effects of sub-bactericidal concentrations of antibiotics in experimental models of endocarditis. J. Antimicrob. Chemother. 15 (Suppl A): 293-296, 1985.
63. FRANCIOLI, P., GLAUSER, M.P.: Successful prophylaxis of experimental streptococcal endocarditis with single doses of sublethal concentrations of penicillin. J. Antimicrob. Chemother 15 (Suppl A): 297-302, 1985.
64. REYMANN, M.T., BRADOC; J.A., COBBS, C.G., DISMUKES, W.E.: Correlation of aminoglucozyde dosages with serum concentrations during therapy of serious gram negative bacillary diseases. Antimicrob. Agents. Chemother 16: 353-361, 1979.
65. GILARDI, G.L.: Pseudomonas. In Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, Jr. W.J., Shadomy, H.J. (Ed): Manual of Clinical Microbiology, ASM, Washington DC, 350-372, 1985.

66. WASHINGTON II, J.A.: Susceptibility tests: agar dilution. In Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, Jr. W.J., Shadomy, H.J. (Ed): Manual of Clinical Microbiology, ASM Washington DC, 967-971, 1985.
67. STEERS, E., FOLTZ, E.L., CRAVES, B.S., RIDEN, J.: An inocula-replicating apparatus for routine of bacterial susceptibility of antibiotics. Antibiot. Chemother. 9: 307-311, 1959.
68. CHISTENSEN, G.D., SIMPSON, W.A., BISNO, A.L., BEACHEY, E.H.: Adherence of slime producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. Infect. Immun. 37: 318-326, 1982.
69. MILLER, M.J., AHEARN, D.G.: Adherence of Pseudomonas aeruginosa to hydrophilic contact lenses and other substrata. J. Clin. Microbiol. 25: 1392-1397, 1987.
70. ROSENBERG, M., GUTNICK, D., ROSENBERG, E.: Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiolgy Letters. 9: 29-33, 1980.
71. SAVOIA, D., MARTINETTO, P., ACHINO, A., PUGLIESE; A.: Adhesion of Proteus species to various cell types. Eur. J. Clin. Microbiol 2: 571-576, 1983.
72. BRADFORD HILL, S.A.: Principles of Medical Statistic. The Lancet Ltd, London, 1971.
73. POLLACK, M.: The virulence of Pseudomonas aeruginosa. Rev. Infect. Dis. 6: (Suppl 3): S617-S626, 1984.
74. JOHANSON, W.G., WOODS, D.E., CHANDHURI, T.: Association of respiratory tract colonization with

- adherence of Gram negative bacilli to epithelial cells. J. Infect. Dis. 139: 667-673, 1979.
75. HIGUCHI, J.H., JOHANSEN, W.G.: The relationship between adherence of Pseudomonas aeruginosa to the upper respiratory cells in vitro and susceptibility to colonization in vivo. J. Lab. and Clin. Med. 95: 698-705, 1980.
76. DAVENPORT, D.S., MASSANARI, R.M., PFALLER, M.A., BALE, M.J., STREED, S.A. HIERHOLZER, Jr. W.J.: Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase negative Staphylococci. J. Infect. Dis. 153: 332-339, 1986.
77. SENSAKOVIC; J.W., BARTELL, P.F.: The slime of Pseudomonas aeruginosa: biological characterization and possible role in experimental infection. J. Infect. Dis. 129: 101-109, 1974.
78. McArthur, H.A.I., CERI, H.: Interaction of a rat lung lectin with the exopolysaccharides of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 42: 574-578, 1983.
79. VISHWANATH, S., GUAY, C.M., RAMPHAL, R.: Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on the adherence of Pseudomonas aeruginosa to tracheobronchial mucin. J. Antimicrob. Chemother. 19: 579-583, 1987.
80. FLETCHER, M., LOEB, G.I.: The influence of substratum characteristic on the attachment of a marine Pseudomona to solid surface. Appl. Environ. Microbiol. 37: 67-72, 1979.



81. FLETCHER, M., MARSHALL, K.C.: Are solid surfaces of ecological significance to aquatic bacteria?. In Marshall, K.C. (Ed): Advances in microbial ecology 84. Plenum Publishing Corp. New York. 6: 199-236, 1983.
82. GARBER, N., SHARON, N., SHOHET, D., LAM, J.S., DOYLE, R.J.: Contribution of hidrophobicity to hemagglutination reactions of Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun. 50: 336-337, 1985.
83. HOGT, A.M., DANKERT, J., VRIES, J.A., FEIJEN, J.: Adhesión of coagulase negative staphylococci to biomaterials. J. Gen. Microbiol. 129: 2959-2968, 1983.
84. ROTROSEN, D., CALDERONE, R.A., EDWARDS, J.E.: Adherence of Candida species to host tissues and plastic surfaces. Rev. Infect. Dis. 8: 73-85, 1986.
85. LJUNGH, A., WADSTROM, T.: Salt aggregation test for measuring cell surface hidrophobicity of urinary Escherichia coli. Eur. J. Clin. Microbiol. 1: 388-393, 1982.
86. MARCUS, H., BAKER, N.R.: Quantitation of adherence of mucoid and nonmucoid Pseudomonas aeruginosa to hamster tracheal epithelium. Infect. Immun. 47: 723-729, 1985.
87. LJUNGH, A., WADSTROM, T.: Fimbriation in relation to hidrophobicity of bacteria in urinary tract infections. Eur. J. Clin. Microbiol. 3: 568-570, 1984 .
88. FRETER, R., JONES, G.W.: Models for studying the

- role of bacterial attachment in virulence and pathogenesis. *Rev. Infect. Dis.* 5 (Suppl 4): S647-S658, 1983.
89. PETERSON, P.K.: How antibiotics augment host defenses. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1: 335-337, 1982.
90. CARBON, C., COLLATZ, E., HUMBERT, G.: Aminoglycosides (aminocyclitols) In Peterson, P.K., VERHOEF, J. (Ed): *The antimicrobial agents annual 1* Elsevier Science Publishers BV, 1-16, 1986.
91. DONOWITZ, G.K., MANDELL, G.L.: Drug therapy: betalactam antibiotics (First of two parts). *New Engl. J. Med.* 318 (7): 419-426, 1988.
92. AUCKENTHALER, R., MICHEA-HAMZEHPOUR, M., PECHEVE, J.C.: In vitro activity of newer quinolones against aerobic bacteria. *J. Antimicrob Chemoth.* 17: 29-39, 1986.
93. KING, A., PHILLIPS, I.: The comparative in vitro activity of eight newer quinolones and nalidixic acid. *J. Antimicrob. Chemoth.* 18: 1-20, 1986.
94. RAEBURN, J.A., GOVAN, J.R.W., McCRAE, W.N., GREENING, A.P.: Ciprofloxacin therapy in cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemoth.* 20: 295-296, 1987.
95. RUBIO, T.T, SHAPIRO, C.: Ciprofloxacin in the treatment of Pseudomonas infection in cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemoth.* 18 (Suppl D): 147-152, 1987.

96. JENSEN, T., PEDERSEN, S.S., HOIBY, N., KOCH, C.: Efficacy of oral fluoroquinolones versus conventional intravenous antipseudomonal chemotherapy in treatment of cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6: 618-622, 1987.
97. JENSEN, T., PEDERSEN, S.S., NIELSEN, C.H., HOIBY, N., KOCH, C.: The efficacy and safety of ciprofloxacin and ofloxacin in chronic Pseudomonas aeruginosa infection un cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemoth.* 20: 585-594, 1987.
98. SMITH, J.T.: The mode of action of 4-quinolones and possible mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemoth.* 18 (Suppl D): 21-29, 1986.
99. WOLFSON, J.S., HOOPER; D.C.: The fluorquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 581-586, 1985.
100. NISHIDA, M.Y., MINE, S., NONOYAMA, S., YOKOTA, Y.: Effect of antibiotics on the phagocytosis and killing of Pseudomonas aeruginosa by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Chemotherapy* 22: 203-210, 1976.
101. MAVROUDI, T.H., GALANAKIS, N., GIAMARELLOU, H.: Effect of sub-MIC_s of various newer antimicrobials on the adherence of Escherichia coli in vitro. In *Proceedings of the IV Mediterranean Congress of Chemotherapy*. Daikos, G.K., Giamarellou, H. (Ed). Rhodos, 573, 1984.
102. ABALIA, I., RODRIGUEZ, E., CISTERNA, R.: Modificación de la unión en cepas de Escherichia coli a células uroepiteliales humanas por

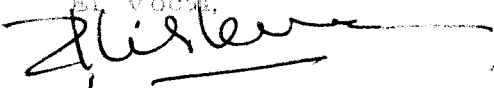

- ciprofloxacin. En Comunicaciones del X Congreso Nacional Microbiologia. Valencia, 264, 1985.
103. MONGIO, F., SORICE, F.: Effect of sub-lethal doses of antibiotics on the bacterial adhesivity of gram negative strains. In Abstracts of the 2nd Congress of Clinical Microbiology, Brighton, 19/1, 1985.
104. RICETTI, M., BUZZI, E., BOTTA, G.A., MORA, E., SCHITO, G.C.: Adherence of mucoid and non mucoid Pseudomonas aeruginosa to human tracheal antibiotics. Abstracts of the 2nd European Congress of Clinical Microbiology, England, 02/4, 1985.
105. GEERS, T.A., BAKER; N.R.: The effect of sublethal concentrations of aminoglycosides on adherence of Pseudomonas aeruginosa to hamster tracheal epithelium. J. Antimicrob. Chemother 19: 561-568, 1987.
106. KLEIN, U., PAWELZIK, M., OPFERKUCH, W.: Influence of betalactam antibiotics, fosfomicin and vancomycin on the adherence (hemagglutination) of Escherichia coli containing different adhesins. Chemother 31: 138-145, 1985.
107. GIDLSFORD, J.R., JESPERSON, J.M.: Effect of antibiotics on adherence of Haemophilus influenzae type b. Antimicrob. Agents. Chemother 30: 370-374, 1986.
108. GLAUSER, M.P., BERNARD, J.P., MOREILLON, P., FRANCILOI, P.: Successful single-dose amoxicillin prophylaxis against experimental streptococcal endocarditis: evidence for two mechanisms of protection. J. Infect. Dis. 147: 568-575, 1983.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. ANA ISABEL SUAREZ BARRNECHEA titulada Efecto de las concentraciones subinhibitorias de antibiogramas sobre la adhesión bacteriana acordó otorgarle la calificación de APTO CON LAUDE

Sevilla, TRES de NOVIEMBRE 1988


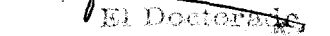
El Vocal,

El Vocal,




El Vocal,

El Presidente

El Secretario

El Doctor

