

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**FACULTAD DE HUMANIDADES**

**MAESTRÍA EN DOCENCIA UNIVERSITARIA  
(EVALUACIÓN EDUCATIVA)**



**CÉSAR VÁSQUEZ GALVÁN**

## ÍNDICE

	Página
Introducción	4
Capítulo 1	
1.1 Antecedentes Históricos	9
1.2 El Inicio de la Genómica Microbiana	11
1.3 Postgenómica	13
1.4 Estudios en Guatemala	14
Capítulo 2	
2.1 Características Generales de las Pseudomonas	18
2.1.1 Anaerobios facultativos y fermentadores microaerófilos	18
2.1.2 No fermentadores aerobios	18
2.1.3 Haemophilus y géneros relacionados	18
2.1.5 Bacilos infrecuentes o de crecimiento difícil	19
2.2 Variabilidad Genética	24
2.3 Plásmidos	26
2.4 Resistencia Natural a los Antibióticos	27
2.5 “Sistema sensor de Quórum”	29
2.6 Virulencia en plantas e invertebrados	32
2.7 Fisiología y estructura	32
2.8 Patogenicidad	33
2.8.1 Exoenzimas S y T	34
2.8.2 Elastasas	35
2.8.3 Proteasa alcalina	35

2.8.4 Rhamnolípidos	35
2.8.5 Citotoxina	36
2.8.6 Alginato	36
2.8.7 Fosfolipasa C	36
2.9 Resistencia a antibióticos	37
2.10 Epidemiología	38
2.11 Síndromes clínicos	39
2.11.1 Infecciones pulmonares	39
2.11.1.2 Infecciones cutáneas primarias	40
2.11.1.3 Infecciones del tracto urinario	41
2.11.4 Infecciones de oídos	41
2.11.5 Infecciones del sistema nervioso central	41
2.11.6 Infecciones auditivas	42
2.11.7 Infecciones oculares	43
2.11.8 Infecciones del aparato digestivo	43
Capítulo 3	
Procedimientos para el Procesamiento del ADN	44
3.1 Secuenciación del ADN	44
3.1.1 Método químico	45
3.1.2 Método enzimático	45
3.1.3 Otros métodos de secuenciación	50
3.1.3.1 Método del escopetazo	50

3.1.3.2 Método 454	51
3.1.3.3 iniciadores fluorescentes	53
3.1.3.4 Sistema de capilaridad electroforética	53
3.2 Procedimientos para el Procesamiento	53
3.2.1 Extracción y Purificación de DNA	54
3.2.2 Cuantificación de DNA	54
3.2.3 Concentración del DNA para su secuenciación	55
3.2.4 Oligonucleótidos	55
Capítulo 4	
Actualizaciones Sobre las Pseudomonas	61
4.1 Virulencia y Patogenicidad	61
4.2 Diagnóstico	64
4.3 Tratamiento	65
4.4 Prevención	66
Conclusión	68
Bibliografía	71
Siglas empleadas	76
Terminología empleada en esta tesis	77
Anexos	79

## Secuenciación Genética de las Pseudomonas

### Introducción

Este trabajo tiene como objetivo general estudiar las pseudomonas, las cuales son bacterias que se encuentran relacionadas con enfermedades, tanto en animales como en plantas, siendo causa de enfermedades infecciosas de la piel, intestino, heridas operatorias y otras formas de infecciones nosocomiales. La importancia que reviste este tipo de bacterias consiste en la diversidad de procesos infecciosos que generan y la variabilidad de su respuesta a la actividad inmunológica de los organismos.

Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran especies como *P. Aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *Pseudomona aeruginosa* es una bacteria gram negativa perteneciente al subgrupo fluorescente de las Pseudomonadaceas de ARNr grupo I de las proteobacterias, mismas a las que pertenecen las enterobacterias. Este tipo de bacteria se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, pudiéndose aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales.

Todas las cepas son potencialmente patógenas para los humanos y algunas pueden infectar también a plantas como *Arabidopsis thaliana*, a invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y a insectos como *Drosophila melanogaster*. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer; capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes. Se ha reportado su aislamiento de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón<sup>1</sup>.

Todos estamos en contacto diariamente con *Pseudomona aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. De hecho, se obtienen aislamientos de esta bacteria a partir de entre el 2 y el 8% de las heces de personas sanas, lo que nos muestra que

---

<sup>1</sup> Murray P. Microbiología Médica. 4ª Ed. 2002. Ed. Grafos S.A. España. pp 293 - 298.

nuestro contacto con esta bacteria es cotidiano y sólo representa una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales. Esta bacteria representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados.

Una vez que desarrolla una infección, produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Entre las proteínas que intervienen en la infección de *P. aeruginosa* encontramos toxinas, como las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por esta bacteria, ya que presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes.

Existe un grupo poblacional especialmente vulnerable a las infecciones con *P. aeruginosa* formado por los enfermos de fibrosis quística. Esta bacteria coloniza muy eficientemente el tracto respiratorio de estos pacientes, y a medida que progresa la infección se seleccionan derivados mucoides de la bacteria que producen grandes cantidades del exopolisacárido alginato. Una vez que se establece una infección por cepas mucoides en los pulmones de estos pacientes, rápidamente alcanzan la etapa terminal de la enfermedad. Esto se debe a que estas cepas no pueden ser eliminadas por el sistema inmune y, hasta el momento, no existe un tratamiento efectivo contra cepas mucoides<sup>2</sup>.

Las pseudomonas representan un problema de patogenicidad en los pacientes hospitalizados, debido a que presentan un alto grado de diseminación y capacidad de sobrevivencia en diferentes tipos de ambientes, motivo por el cual, pueden permanecer en las salas hospitalarias y desarrollar procesos infecciosos de manera permanente, sobre todo en pacientes con quemaduras y heridas quirúrgicas y no quirúrgicas.

---

<sup>2</sup> Jawetz. Microbiología Médica. 17ª Ed. 2002. Ed. Manual Moderno. México. pp 285 – 287.

Otro problema de importancia médica se refiere a las capacidades que presenta para desarrollar resistencia a diferentes antibióticos, lo cual dificulta el tratamiento y el control de una infección, por lo cual los pacientes tienen alto riesgo de enfermarse o fallecer. Esta capacidad de resistencia a los antibióticos es facilitada por la presencia de plásmidos, los cuales son portadores de genes de resistencia a diferentes tipos de antibióticos. Los conocimientos sobre la naturaleza de los plásmidos, su secuencia de nucleótidos, así como la comprensión de la secuencia de nucleótidos del cromosoma bacteriano, servirán para lograr un mejor control en la prevención, así como en el tratamiento de este tipo de bacterias.

El presente trabajo tiene el propósito de evidenciar los conocimientos que se han alcanzado en la actualidad con relación a la caracterización de esta bacteria, así como con relación a la naturaleza de su genoma, características patogénicas y procedimientos de biología molecular para la secuenciación genética, al mismo tiempo que permitirá ampliar el conocimiento para el estudio de otros tipos de bacterias que también se manifiestan con alto grado de patogenicidad y con características similares en cuanto a su capacidad de mutaciones y resistencia a los antibióticos por la presencia de plásmidos.

La información descrita en el presente trabajo sobre esta bacteria, fue obtenida de documentación actualizada y abarca todos los aspectos posibles con relación a sus características generales y específicas, reflejando al mismo tiempo, la importancia que representa desde el punto de vista patógeno y el alto grado de morbilidad que desarrolla a nivel intrahospitalario. Los procedimientos de secuenciación genética que se describen, fueron obtenidos también de fuentes actuales, exponiendo los contenidos de los procedimientos originales, las técnicas más modernas que existen, así como los pasos a seguir para su realización.

Este trabajo es útil como material de consulta acerca de las características de las pseudomonas como bacterias patógenas causantes de una variedad amplia de procesos infecciosos en todo tipo de pacientes, especialmente en los que presentan deficiencias del sistema inmunológico o los que presentan enfermedades crónicas como cáncer, deficiencia renal, etc. Se podrán

identificar aspectos como: crecimiento y desarrollo bacteriano, medios de cultivo, resistencia a los antibióticos, tipos de toxinas, cuadros clínicos, métodos diagnósticos, características del genoma, métodos y técnicas de secuenciación; aspectos que fueron investigados en diferentes fuentes como libros de texto, artículos de revista y páginas de internet. Tanto este material como las fuentes mencionadas, sirven además, para futuras investigaciones sobre los temas descritos.

La secuenciación del ADN descrita en este trabajo, es una actividad que nos permite caracterizar nuevos genes, detectar mutaciones genéticas que pueden favorecer la variabilidad en las especies de bacterias. Es un procedimiento que tiene múltiples aplicaciones para la investigación en áreas relacionadas con medicina, veterinaria y agricultura, entre las que se mencionan como más importantes: el estudio de genes y sus mutaciones, secuenciación de genomas y plásmidos bacterianos, estudio de las bases moleculares de múltiples fenómenos biológicos, como la resistencia bacteriana, estudio de la variación genética de las especies.

En este trabajo se da a conocer la importancia de las pseudomonas como bacteria patógena y que es capaz de provocar alta morbilidad y mortalidad en los pacientes hospitalizados que son infectados. Al mismo tiempo se describen los principales métodos y procedimientos para la secuenciación genética de las bacterias, como una de las formas modernas para conocer los mecanismos por los cuales esta bacteria es altamente patógena, porqué desarrolla resistencia contra antibióticos y cuáles serían las formas y esquemas para un mejor tratamiento y prevención.

En Guatemala se cuenta con muy escasa información publicada sobre este tipo de bacterias, debido a la falta de estímulos y apoyos para la realización de proyectos de investigación. Se realizan con relativa frecuencia estudios para este tipo de procesos infecciosos como parte de las actividades docentes, pero esos trabajos no se publican, sino que generalmente se descartan luego de ser revisados y calificados por el docente responsable. Las publicaciones sobre esta bacteria son muy escasas, habiéndose localizado algunas tesis que

contienen aspectos relacionados con diferentes tipos de bacterias, entre las que se mencionan a las pseudomonas.

Los médicos que atienden este tipo de pacientes conocen muy bien estos procesos infecciosos por referencias de trabajos realizados en otros países y que son publicados en revistas internacionales, el internet o cuando son conocidos en los congresos, cursos o talleres; pero fundamentalmente cuentan con la experiencia de su práctica clínica intra o extrahospitalaria, misma que es transmitida a sus estudiantes durante las prácticas docentes.

Para la descripción de los aspectos contenidos en este trabajo, se consultaron libros de texto, artículos de revistas y páginas de internet, en las que se revisaron: 1. características de la bacteria, 2. naturaleza del genoma, 3. aspectos patogénicos, 4. epidemiología, 5. síndromes clínicos, 6. métodos de secuenciación del ADN. Después del desarrollo de estos temas se presentan las conclusiones del trabajo. Posteriormente se da a conocer un listado de la terminología empleada con su respectivo significado, y al final se exponen tres anexos referidos en el texto.

## Capítulo 1

### 1.1 Antecedentes Históricos

Las primeras observaciones con relación a las causas de las enfermedades infecciosas datan del siglo XIII, cuando Roger Bacon postuló que la enfermedad era producida por "criaturas invisibles". Más tarde Fracastoro de Verona (1483-1553) postuló que los gérmenes eran transmitidos de una persona a otra. En 1658 el monje Kircher reconoció el significado de los microbios en la enfermedad llamándolos "gusanos invisibles". Von Plenciz, en 1762, propuso que diferentes gérmenes producen diferentes enfermedades; sin embargo esos hombres no presentaron prueba alguna de sus aseveraciones.<sup>3</sup>

Anthony van Leeuwenhoek, nacido en Delft, Holanda, en 1632, al construir microscopios con lentes de aumentos entre 200 a 300, logró la observación directa de los microorganismos, que reportó cuidadosamente con dibujos que aún ahora es fácil reconocer. Si bien el estudio de los microbios se inició en el siglo XIX, principalmente en un contexto médico, sus reportes exactos de la ubicuidad de los microorganismos facilitaron a los posteriores microbiólogos de la "Edad de oro de la microbiología", 200 años más tarde, el descubrimiento de su asociación con la enfermedad infecciosa, su implicación en la reacciones de fermentación, la producción de compuestos para combatir las infecciones, entre otros aspectos.

Los primeros estudios de Pasteur (1822-1895)<sup>4</sup> se relacionan con la producción de vino, en la ciudad de Lille; estaba convencido de que la fermentación es un proceso biológico en donde intervenían "fermentos", como él llamó a las cosas vivas que observaba en el microscopio.

De forma relativamente sencilla, Pasteur demostró que el desarrollo de un microorganismo ocurre sólo si existen microorganismos preexistentes; para lo cual diseñó un matraz especial. Como resultado de sus observaciones formuló la teoría de los gérmenes: la fermentación y putrefacción son causadas por microorganismos que son ubicuos. Constató que la vida microbiana no aparece

---

<sup>3</sup> Baca BE. La microbiología. De sus inicios a la genómica. <http://www.elementos.buap.mx/num49/pdf>

<sup>4</sup> Dubos, R., Pasteur and modern science, ASM Press, Washington D. C., 1988.

en un medio que ha sido esterilizado y protegido de contaminación posterior. Los microorganismos no emergen del material en descomposición, sino que vienen del exterior; un líquido estéril expuesto al aire estéril permanecerá estéril.

Como resultado de estos conocimientos desarrolló técnicas de destrucción de microorganismos como la pasteurización, la cual consiste en esterilizar varias veces a temperaturas altas y por tiempos cortos.

Otro de los científicos que, junto con Pasteur, puede ser considerado uno de los padres de la microbiología, fue Robert Koch (1843-1910).<sup>5</sup> El ántrax era una enfermedad importante que aquejaba a animales domésticos y que ocasionalmente afectaba a la gente. Koch inició sus investigaciones como un pasatiempo, sin imaginar que llegarían a ser un modelo para el estudio de la naturaleza bacteriana en su relación con la enfermedad infecciosa.

Sus análisis microscópicos de muestras de sangre de ovejas infectadas le permitieron descubrir el agente causal de la enfermedad, describiéndolo como un bacilo grande que presentaba puntos translúcidos (que posteriormente identificó como esporas, *dauersporum*). Con este material inoculó conejos en la oreja; el animal murió luego de 24 horas. Empleó el humor del ojo del animal como un medio de cultivo artificial para hacer crecer la bacteria, obteniendo, así, un cultivo puro del microorganismo que llamó *Bacillus anthracis*; esto implicaba que el ántrax era causado por un organismo específico.

Muchos científicos han recibido el premio Nobel por sus aportaciones en la fisiología, genética y metabolismo microbiano. Publicados en 1946 por Avery, McCarty y MacLeod, los experimentos de transformación bacteriana con el neumococo demostraron que el material genético de la herencia es el DNA. La predicción del modelo de Watson y Crick de la replicación semiconservativa del DNA fue determinado en la bacteria *Escherichia coli* por Meselson y Stahl.

Fue la bioquímica microbiana la que contribuyó a la apreciación que tenemos de la unidad de la bioquímica de la célula. Los sistemas bacterianos fueron el punto de partida para la descripción del ácido ribonucleico que lleva el mensaje genético (RNAm), la solución del código genético, y el discernimiento de los procesos que regulan la expresión genética por Jacob y Monod. La noción de los virus latentes y el concepto de la transferencia horizontal (la transferencia

---

<sup>5</sup> Brock, T. D., Robert Koch, A life in medicine and bacteriology, ASM Press, Washington D. C., 1999.

de genes entre las bacterias mediada por plásmidos), fueron desarrollados principalmente en sistemas bacterianos.

En el pasado, los microbiólogos desarrollaron programas de investigación para mejorar la producción de un compuesto dado, modificando las condiciones de cultivo, obteniendo mutantes, o bien, actualmente, usando la metodología de ADN recombinante (o recombinado).<sup>6</sup> Estas técnicas han ayudado a mejorar significativamente la producción de un metabolito determinado. Por ejemplo, una cepa modificada de *Pseudomonas denitrificans* produce 100,000 veces más de la vitamina B12.

## 1.2 El Inicio de la Genómica Microbiana

En julio de 1995, J. Craig Venter y Hamilton O. Smith, de la compañía Celera Genomics, y Claire M. Fraser del The Institut for Genomic Research (TIRG)<sup>7</sup>, publicaron la primera secuencia completa del cromosoma de un microorganismo: *Haemophilus influenzae* cepa Rd. Este hecho marcó un hito en la historia del estudio de los microorganismos. El análisis de la secuencia mostró algunas sorpresas. De 1,743 ORF (open reading frame, por sus siglas en inglés, o marco abierto de lectura, es decir secuencias que son susceptibles de codificar para una proteína), sólo 1,007 pudieron ser asignadas a una función basándose en la similitud con secuencias de proteínas previamente descritas.

El grupo de Fraser continuó con la secuencia del genoma de *Mycoplasma genitalium*, bacteria que tiene el genoma más pequeño de las especies bacterianas conocidas. Les interesaba conocer el número y calidad de genes esenciales de la célula. Posteriormente continuaron con el genoma de *Methanococcus jannaschii*, una extraordinaria arqueobacteria aislada de las costas de México a 2,600 metros de profundidad, a 200 atmósferas de presión, que crece a 85°C, y es capaz de transformar el CO<sub>2</sub> a metano y generar la energía para su metabolismo.

---

<sup>6</sup> Demain, A. L., Microbial natural products: alive and well in 1998, *Nature Biotechnol*, 16:3-4, 1998.

<sup>7</sup> Venter, J. C., Smith, H. O., and Fraser, C.M., Microbial genomics in the beginning, *ASM News*, 65: 322-327, 1999.

La secuencia arrojó los datos siguientes: alrededor del 50% de genes no se relacionan con secuencias previas, sugiriendo que codifican para mecanismos fisiológicos inexplorados. Ese mismo año se completó la secuencia del genoma del primer eucarionte (*Saccharomyces cerevisiae*), habiéndose encontrado aproximadamente 6,000 genes, y al menos otros 2,000 de función desconocida.

A partir del análisis de estas primeras secuencias, varias agencias internacionales iniciaron programas sistemáticos de secuenciación de microorganismos. Como una parte de las iniciativas para explorar la contribución de los microorganismos en el secuestro global del carbono, el Instituto JGI (The Joint Genomic Institute) secuenció el genoma de la bacteria *Nitrosomonas europaea*. Este organismo tiene un papel central en la disponibilidad del nitrógeno en las plantas y por tanto limita la fijación de CO<sub>2</sub>. *Rhodospseudomonas palustris* es una bacteria fototrófica capaz de convertir la luz solar en energía celular al fijar el CO<sub>2</sub>, el N<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>. También degrada y recicla una variedad de compuestos aromáticos. La bioenergía puede ser un medio práctico para obtener una fuente de energía barata limpia e ilimitada, por medio de la utilización de estos microorganismos.

Actualmente han sido publicadas 15 secuencias de arqueobacterias, 59 de bacterias y sólo una de eucariotes. En curso, no concluidas: 11 de arqueobacterias, 261 de bacterias y 3 de microorganismos eucariotes. Ejemplos de ellas son las secuencias de protozoarios como *Entamoeba histolytica*, *Leishmania chagasi*, *Gardia lamblia*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, de hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*.

La velocidad con que un genoma microbiano es secuenciado actualmente es muy grande, gracias a dos metodologías que han acelerado notablemente el proceso: el empleo de nucleótidos marcados con reactivos fluorescentes y las poderosas herramientas computacionales utilizadas en la resolución de la secuencia.

*P. aeruginosa* es un organismo que fue descrito por primera vez en el año 1882, que necesita oxígeno para desarrollar. Se trata de bacilos Gram

Negativos, agrupados en parejas de cadenas cortas o aisladas, que poseen un flagelo polar, aunque raras veces poseen 2 o 3, son móviles y no esporulados<sup>8</sup>. En agosto del año 2000 se concluyó la secuencia completa del genoma de la cepa PAO1, que es la cepa tipo de *P. aeruginosa* y que fue aislada de un paciente con otitis media. Esta secuencia se encuentra disponible en el internet y su análisis está publicado (ver anexo 1).

Por otra parte, recientemente se secuenció el genoma de *Pseudomonas putida* KT2440, que es una bacteria ambiental estrechamente relacionada con *P.*

*aeruginosa*, al grado de que 85% del genoma de *P. putida* KT2440 tiene homólogos en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1.

### 1.3 Postgenómica

A raíz de la consolidación del programa genético en los últimos años, la postgenómica es el punto de partida para las investigaciones en el futuro. Al estudio del transcriptoma (el repertorio de las moléculas de ARN mensajero que se expresan) y el proteoma (el análisis de las proteínas y su condición, ya sea normal o patológica), se le ha llamado comúnmente postgenómica.

El conocimiento de los genomas de los microorganismos nos facilitará la tarea de su estudio; sin embargo, su conocimiento no reemplaza la necesidad de conocer las funciones que realizan en la célula. El número de genes importantes sin caracterizar subraya el hecho de que contar con el genoma de un microorganismo es justo el punto de inicio para su comprensión y estudio. Por lo tanto, el gran reto para el futuro es definir las funciones de las proteínas del genoma y descifrar las redes funcionales de regulación.

Los datos aportados actualmente indican que un microorganismo puede contener alrededor de 1,000 a 5,000 genes, de los cuales 20-70% transcriben para proteínas putativas que son descritas como de función desconocida. Algunas de la proteínas reguladoras pueden tener una docena de funciones celulares que pueden variar de una célula microbiana a otra; además, una proteína puede contener varios dominios funcionales lo cual complica el

---

<sup>8</sup> Walter T. Microbiología. 2000. McGraw-Hill Interamericana. pp 181 – 189.

análisis estructura-función. Desde luego, la genómica es sólo el primer paso para discernir los procesos fundamentales que gobiernan la vida.

El gran reto en el futuro es definir la función de las proteínas codificadas por el genoma, incluyendo el gran número de nuevas proteínas de función desconocida, y descifrar las redes funcionales de los genomas. Integrar los resultados de los esfuerzos de secuenciación con la información existente y con una base de datos bien desarrollada producirá un panorama amplio del metabolismo celular y de la función genética.<sup>9</sup>

#### 1.4 Estudios en Guatemala

Las publicaciones realizadas en Guatemala se refieren a infecciones nosocomiales de diferentes tipos bacterianos, entre los que se mencionan a este tipo de bacteria. A continuación se describen algunas de las tesis en las que más se evidencia la importancia de estos microorganismos.

En un estudio realizado en el hospital de Chiquimula en 1985, se encontró *P. aeruginosa* en un 22.86% en las heridas postoperatorias; habiéndose encontrado al mismo tiempo *Pseudomonas sp* en las paredes del edificio.<sup>10</sup>

En otro estudio realizado en un hospital privado se encontró *Pseudomona sp* en muestras de traqueotomía y de secreciones bronquiales en un 14.9% en 1980, así como un 18.8% en 1981, la cual era resistente a Ampicilina y Cefalotina.<sup>11</sup>

En 1986 en el hospital de ginecoobstetricia del IGSS se encontró *P. aeruginosa* en un 18.8% en pacientes de cirugía, así como un 2.13% en cultivo de líquido cefalorraquídeo. En este mismo estudio se aisló *Pseudomona mallei* de campos, tijeras y agujas estériles en cirugía; habiéndose aislado *P. aeruginosa* de secreciones vaginales. Se reportó el fallecimiento de una niña por bacteriemia (infección en la sangre) debido a *P. aeruginosa*.<sup>12</sup>

---

<sup>9</sup> Baca BE. Op cit P. 7

<sup>10</sup> Recinos Z. Microbiología y Epidemiología de Heridas Postoperatorias en Chiquimula. Tesis. 1985.

<sup>11</sup> Rodríguez C. Infección Nosocomial en un Hospital Privado. Tesis. 1985.

<sup>12</sup> Rodríguez A. Frecuencia de Microorganismos Causantes de Infección Nosocomial en el Hospital de Ginecoobstetricia del IGSS. Tesis. 1986.

En 1995 se realizó un estudio en el Hospital San Juan de Dios, para determinar la frecuencia, así como su sensibilidad a antibióticos, de bacilos no fermentadores en pacientes en encamamiento; habiéndose encontrado un 72% de *P. aeruginosa* y un 11% de *P. fluorescens*, las cuales eran resistentes en un 90.56% a Amoxicilina, Ac. Clavulónico, Ampicilina, Sulbactam, Cefoperazone, Ciprofloxacina, Ceftacidina, Imipenem, Tobramicina y Ticarcilina.<sup>13</sup>

En 1997 se realizó un estudio en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Roosevelt, habiéndose encontrado infecciones por *Pseudomonas* en un 17.1% entre diferentes tipos de bacterias, seguidas por *Acinetobacter* en un 13.1%, *Klebsiella* en un 9.7%, estafilococos en un 8.6%, así como otros tipos de microorganismos.

Las *Pseudomonas* estudiadas eran resistentes a penicilinas y cefalosporinas. El 17.3 % de estos pacientes presentaron neumonía por *Pseudomonas*, casos en los cuales estas bacterias fueron resistentes a Ceftazidima, Piperacilina, Ampicilina, Cefalotina y Trimetoprim Sulfametoxazol<sup>14</sup>.

En junio de 1999 se realizó un estudio en el departamento de Pediatría del Hospital Roosevelt en menores de 12 años, habiéndose encontrado infecciones por *Pseudomonas* en 30 pacientes, de los cuales el 50% presentaron *P. aeruginosa* y un pequeño porcentaje *P. fluorescens*, en las cuales se encontró una resistencia elevada a los antibióticos: ceftazidima, ticarcilina, gentamicina e imipenem, mientras que se obtuvieron datos de resistencia bajos a Ciprofloxacina.

En el presente estudio no se encontró ninguna diferencia de susceptibilidad a las *Pseudomonas* por sexo, pero sí se encontró que las infecciones por estas bacterias se presentan con mayor frecuencia en neonatos y en menor frecuencia conforme se incrementó la edad en estos niños. Las bacterias fueron aisladas de sangre, heces, secreciones bronquiales y catéteres intravenosos<sup>15</sup>.

---

<sup>13</sup> Ortuno A. Determinación del Bacilo G-1 No Fermentador más Frecuente, aislado de Muestras de Pacientes en Encamamiento del Hospital San Juan de Dios y su Sensibilidad Antibiótica. Tesis. 1995.

<sup>14</sup> López R. Sensibilidad de Bacterias Aisladas en Pacientes con Neumonía Nosocomial a los Antibióticos. Tesis Facultad de Ciencias Médicas, USAC. 1998.

<sup>15</sup> Ruano M. Resistencia de *Pseudomonas* a diferentes antibióticos en el paciente pediátrico. Tesis Facultad de Ciencias Médicas, USAC. 1999.

En el año 2001 se realizó un estudio en el Hospital Roosevelt para determinar la resistencia de gérmenes Gram-negativos, habiéndose encontrado que el antimicrobiano más activo contra Pseudomonas en adultos y niños es Piperacilina-tazobactam, luego Cefepime, mientras que la resistencia a cefalosporinas de 3ª generación y aminoglucósidos es menor de 50%<sup>16</sup>.

En el 2002 se realizó un estudio en el Hospital San Juan de Dios para valorar los costos de las infecciones nosocomiales (entre las que se incluyen a las causadas por Pseudomonas), habiéndose evidenciado un marcado exceso de costos entre los pacientes que sufrieron una infección intrahospitalaria en comparación con los controles. El promedio de costo adicional por cada caso osciló entre un total de alrededor de US\$70, presentado por la infección de herida operatoria, hasta un máximo que superó los US\$2,500 el exceso que se gastó por cada niño que adquirió una neumonía nosocomial en el área de cuidado intensivo pediátrico.

Al aplicar el exceso promedio de costos al total de casos de cada una de las entidades clínicas consideradas en el año 2000, el monto total ascendió a US\$335,035, sin considerar los gastos por otras entidades clínicas no estudiadas como las infecciones asociadas a catéteres urinarios e intravenosos, infecciones del sistema nervioso central, diarreas nosocomiales o infecciones por otras entidades quirúrgicas.

En el presente estudio solo se incluyeron infecciones del área materno-infantil, sin considerar los servicios de cirugía y medicina de adultos<sup>17</sup>.

También en el hospital Roosevelt se realizó un estudio en el 2002 para determinar el impacto económico que tenían las infecciones nosocomiales, habiéndose encontrado durante ese año un total de 116 neumonías nosocomiales en la unidad de cuidado crítico de adultos y 112 en intensivo pediátrico, así como 34 bacteriemias (infección en la sangre) nosocomiales en ambos intensivos y 12 infecciones del tracto urinario.

---

<sup>16</sup> Cazali I y Cols. Resistencia de Gérmenes Gram-Negativos en un hospital de Referencia de Guatemala. Revista de Reccavir. Vol 1 No. 1. 2001. P 16.

<sup>17</sup> Gracioso C y Cols. Costo de la Infección Intrahospitalaria en Áreas de Cuidado Materno-Infantil en el hospital General San Juan de dios de la Ciudad de Guatemala. Revista de Reccavir. Vol 1 No. 2. 2002. P 54.

El exceso de costo debido a infecciones nosocomiales detectadas por el sistema de vigilancia resultó ser de US\$285,821, lo cual representa el 2.6% del presupuesto total del hospital (US\$10.766,260)<sup>18</sup>.

---

<sup>18</sup> Mejía C y Cols. Impacto Económico de la Infección Nosocomial en el hospital Roosevelt, Ciudad de Guatemala 2000. Revista de Reccavir. Vol 1 No. 2. 2002. P 34.

## Capítulo 2

### 2.1 Características Generales de las Pseudomonas

Las Pseudomonas son bacilos gramnegativos aerobios, clínicamente importantes, pudiéndose clasificar de manera artificial en los cuatro siguientes grupos generales:

#### 2.1.1 Anaerobios facultativos y fermentadores microaerófilos:

Estas bacterias pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales, ya sea en aerobiosis o anaerobiosis. Tienen capacidad para degradar hidratos de carbono. Crecen sólo en presencia de bajas concentraciones de oxígeno. Entre el 70 y el 90% de las pseudomonas corresponden a este grupo. Pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitrato o arginato como aceptor terminal de electrones. Ej, *Pseudomona aeruginosa*.

#### 2.1.2 No fermentadores aerobios:

Entre el 10 y el 15% se encuentran dentro de este grupo. Utilizan los carbohidratos a través del metabolismo respiratorio en el que el oxígeno es el aceptor terminal de los electrones. Tienen uno o más flagelos polares, suelen ser oxidasa positivas y crecen en medios muy simples. Se dividen en cinco grupos con base en su homología de ARN ribosómico. Sólo los grupos I, II y V son patógenos para la especie humana. p. Ej., *Pseudomonadaceae*.

#### 2.1.4 *Haemophilus* y géneros relacionados:

Bastoncillo Gram negativo pequeño (cocobacilo). Es no hemolítico y no fermenta la fructosa. Desarrollan infecciones pulmonares y del tracto respiratorio superior, así como también epiglotitis y meningitis. Corresponde del 10 AL 15%. Se han aislado del tracto digestivo y genitourinario en un número relativamente bajo en donde pueden desarrollar endometritis.

### 2.1.5 Bacilos infrecuentes o de crecimiento difícil:

Corresponde a menos del 5%. Se clasifican dentro del grupo de los bacilos poco frecuentes o de crecimiento exigente<sup>19</sup>.

Las *Pseudomonas* y otros bacilos relacionados son una compleja variedad de patógenos oportunistas de plantas, animales y humanos. Para complicar la comprensión de estos microorganismos, la clasificación taxonómica ha sufrido numerosos cambios en los últimos años. *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii* y *Moraxella catarrhalis* constituyen más del 75% de todos los aislamientos.

Las *Pseudomonas* son microorganismos ubicuos que se encuentran en la tierra, en la materia orgánica en descomposición, en la vegetación y en el agua. Se encuentran también en el ambiente hospitalario en reservorios húmedos, como la comida, las flores, en los jarrones, las pilas, los baños, las fregonas, los respiraderos y los equipos de diálisis, e incluso las soluciones desinfectantes. Es infrecuente que forme parte de forma persistente de la flora microbiana normal de los humanos, excepto en los pacientes hospitalizados y en los pacientes ambulatorios inmunodeprimidos.

El grupo de bacterias relacionadas con el género *Pseudomonas* es muy amplio y comprende especies patógenas para humanos *P. cepacia* (patógeno oportunista que puede causar infecciones muy serias con alta tasa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Especialmente han aumentado los datos de infecciones producidas en los pulmones de pacientes con fibrosis quística) y *P. aeruginosa*. Hay especies patógenas vegetales como *P. solanacearum* que produce marchitación, *P. syringae* causante de manchas cloróticas en ciertas plantas y *P. marginalis* causante de pudriciones blandas en las raíces de las plantas.

---

<sup>19</sup> Murray P. Op cit p. 2



Fig. 1 Desarrollo de *Pseudomonas* en medio de cultivo. Se observan colonias redondas, convexas y opacas.

Existen varios géneros bacterianos estrechamente relacionados con el de *Pseudomonas* que también tienen una importancia especial: el género *Xanthomonas* comprende varias especies patógenas vegetales que producen necrosis del follaje. El género *Zooglea* comprende varias especies capaces de producir agregados celulares de gran tamaño que intervienen de forma importante en la digestión de las aguas orgánicas de ciudades e industrias, y los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, de los que hablaremos más adelante, que son capaces de oxidar alcoholes y tienen importancia industrial en la fabricación de vinagre<sup>20</sup>.

*P. aeruginosa* tiene una extraordinaria capacidad para adaptarse a diversos ambientes y tiene, además, la particularidad de no presentar una población clonal típica<sup>21</sup>. Esto es, su población tiene una estructura clonal superficial que participa muy frecuentemente en eventos de recombinación, de los que ocasionalmente surgen clonas que compiten favorablemente con otras y las desplazan. Estas características poblacionales plantean una serie de interrogantes acerca de la manera en que esta bacteria ha evolucionado. A diferencia de la estructura poblacional de *P. aeruginosa*, otras especies de *Pseudomonas* como *P. fluorescens* parece tener una estructura clonal típica.

---

<sup>20</sup> Murray P. Op cit p. 2

<sup>21</sup> Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen., R. J. Dodson, H. Hilbert, 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolic versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Environ. Microbiol. 4: 799-808.

La amplia distribución ambiental de *Pseudomonas* es posible por sus sencillos requerimientos de crecimiento. Son capaces de utilizar muchos compuestos orgánicos como fuentes de carbono y de nitrógeno, y algunas cepas crecen incluso en agua destilada usando los restos de los nutrientes. Las especies de *Pseudomonas* poseen muchos factores estructurales, enzimas y toxinas que aumentan su virulencia a la vez que los hacen resistentes a los antibióticos que se usan con más frecuencia.

Estos microorganismos podrían ser unos patógenos más frecuentes, teniendo en cuenta su presencia ubicua, su capacidad de crecer en prácticamente cualquier ambiente, sus propiedades de virulencia y su resistencia a múltiples antibióticos. Las infecciones por *Pseudomonas* son fundamentalmente oportunistas (es decir, restringidas a los pacientes con compromiso de los mecanismos de defensa del huésped). Esta característica muestra la importancia de la capacidad del huésped para prevenir la colonización y evitar una posterior invasión por *Pseudomonas*.

*Pseudomonas aeruginosa* es el patógeno más importante de las infecciones intrahospitalarias en las Unidades de Terapia Intensiva (UTI) y es un auténtico problema a la hora de escoger el tratamiento antibiótico, dado que ningún antibiótico alcanza una sensibilidad > 90%, lo que apoya que en el caso de sospechar la implicación de *P. aeruginosa* en una infección, es aconsejable utilizar tratamiento combinado. Es un germen intrahospitalario oportunista que produce infecciones cuando el huésped tiene alteradas las defensas, principalmente en pacientes con quemaduras extensas, leucémicos, transplantados, etc.<sup>22</sup>

*P. aeruginosa* representa un modelo de gran interés que, como veremos más adelante, ha sido estudiada desde múltiples enfoques. Muchos autores incluso la han considerado como un organismo ubicuo. Es el único caso conocido de una bacteria ambiental en la que todos los aislamientos son potencialmente patógenos para el hombre. Es también una característica particular de esta bacteria el arreglo de los genes que intervienen en la virulencia de la bacteria, ya que no están codificados en las llamadas “islas de patogénesis” como en las

---

<sup>22</sup> Jawetz. Op cit p. 2

demás bacterias patógenas, sino se encuentran interdispersas en su cromosoma.

La colonización de distintos ambientes por *P. aeruginosa* y la patogenia de los aislamientos ambientales nos plantean interrogantes evolutivas muy importantes que hacen fascinante el estudio de esta bacteria. Entre otras podemos hacernos las siguientes preguntas: ¿qué ventaja selectiva le da la producción de los factores de virulencia a las pseudomonas viviendo en el medio ambiente? ¿cómo pueden estas bacterias adaptarse a ambientes tan diversos?, y ¿por qué es distinto el arreglo genético de los genes que intervienen en la virulencia de la bacteria al de otras bacterias patógenas? El estudio de esta bacteria nos permitirá, pues, contestar problemas fundamentales acerca de la manera en la que se adapta a múltiples condiciones ambientales<sup>23</sup>.

En ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies, produciendo una especie de agregado llamado biopelícula (biofilm). La formación de estos cúmulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud pues contamina dispositivos que se implantan dentro del cuerpo, como por ejemplo dispositivos intrauterinos, catéteres<sup>24</sup> o válvulas cardíacas. Las biopelículas también representan un problema en el proceso de producción de diversas industrias pues provocan taponamiento y corrosión de conexiones y filtros.

Asimismo, *P. aeruginosa* presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas. Sin embargo, a la vez que las pseudomonas causan al hombre distintos problemas, esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Así se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada, que produce biosurfactantes que son útiles para la limpieza de suelos contaminados con

---

<sup>23</sup> Liang, X., X. Q. Pham, M. V. Olson & S. Lory. 2001. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183: 843-853.

<sup>24</sup> Frantz, B. & A. M. Chakrabarty. 1986. Degradative plasmids in *Pseudomonas*, p 295-325. In: I. C. Gunsalus, J. R. Sokatch (ed.), *The Bacteria*, vol. X. Academic Press, Inc. Orlando, Fla.

hidrocarburos o con metales pesados; y que produce enzimas, como la lipasa, con distintas aplicaciones potenciales<sup>25</sup>.

*P. aeruginosa* representa un modelo de gran interés que, como veremos más adelante, ha sido estudiada desde múltiples enfoques. Esta bacteria es una de las bacterias más estudiadas a nivel molecular y su genoma ha sido totalmente secuenciado. El tamaño aproximado del único cromosoma circular que forma el genoma de esta bacteria es de cerca de 6.3 millones de pares de bases. El genoma de esta bacteria es grande comparado con otros genomas bacterianos. Esta característica la comparte con otras proteobacterias y con bacterias gram-positivas como es el caso de *Streptomyces coelicolor* A3 que fue secuenciada recientemente. La cepa PAO1 que fue secuenciada no contiene plásmidos al igual que muchos otros aislamientos de estas bacterias.

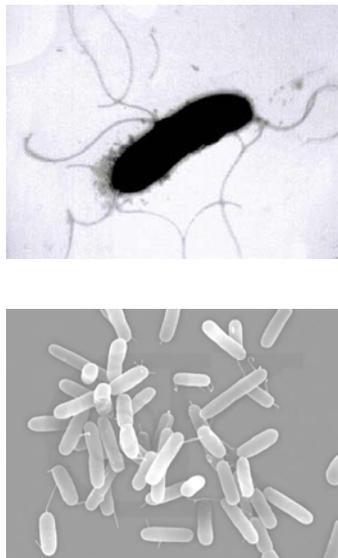


Fig. 2 Estas son fotografías de microscopía electrónica en donde se muestran las características morfológicas de las *Pseudomonas*. Son bacilos con diversas estructuras de superficie.

Del análisis del genoma de esta bacteria es notoria la gran abundancia de genes que parecen codificar para bombas que sacan compuestos de la célula. La abundancia de estos transportadores pudiera estar relacionada con su alta resistencia a distintos compuestos tóxicos y, en última instancia, con su extraordinaria versatilidad.

---

<sup>25</sup> Holloway, B. W. 1978. Plasmids that mobilise bacterial chromosomes. *Plasmid*. 2: 1-19.

## 2.2 Variabilidad Genética

En agosto del año 2000 se concluyó la secuencia completa del genoma de la cepa PAO1, que es la cepa tipo de *P. aeruginosa* y que fue aislada de un paciente con otitis media. Esta secuencia se encuentra disponible en el internet y su análisis está publicado (ver anexo 1).

Más de la mitad de los genes de *P. aeruginosa* PAO1 presentan una homología cercana y un arreglo transcripcional en operones similar a los de *Escherichia coli*. También es aparente que *P. aeruginosa* presenta homología en la secuencia y en la organización genética con bacterias ambientales, incluso con bacterias grampositivas. El 32% de los genes predichos a partir de la secuencia del genoma de esta bacteria no tienen homología con las secuencias depositadas en los bancos de datos, lo que sugiere que se trata de genes que codifican para actividades enzimáticas novedosas<sup>26</sup>. El proyecto de secuenciación del genoma de la cepa PAO1 fue realizado por la fundación para la Fibrosis Quística, la Universidad de Washington, y la compañía PathoGenesis. El interés de estas organizaciones es fundamentalmente clínico, ya que su objetivo principal es encontrar nuevos fármacos y otras herramientas para combatir las infecciones por *P. aeruginosa*.

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

Contrariamente a lo que ocurre con otras bacterias patógenas, no existen clones de *P. aeruginosa* asociadas con el desarrollo de una enfermedad, por lo que la frecuencia de las distintas clones es la misma entre los aislamientos ambientales y clínicos. Esto es, en una determinada región geográfica se

---

<sup>26</sup> Cervantes, C & S. Silver. 1996. Metal resistances in Pseudomonads: Genes and mechanisms. In: Molecular biology of Pseudomonads. T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas and S. Silver (eds.) ASM Washington DC, pp 398-416.

encuentra que la frecuencia con la que se aísla una cepa es la misma si se muestrean hospitales, pacientes con distinto tipo de infecciones o se toman muestras ambientales. Sin embargo existe una gran variabilidad genética entre distintos aislamientos de esta bacteria aunque sean aisladas de la misma región, y se ha encontrado una alta frecuencia de rearrreglos génicos<sup>27</sup>. Esta variabilidad tiene características muy particulares, como a continuación veremos.

El tamaño del genoma de distintas cepas de *P. aeruginosa* varía entre 5 y 7 millones de pares de bases, y comprende un mosaico de genes específicos de la especie que va del 70 al 90% de la secuencia de ADN de una cepa. Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad de información accesorio que cada cepa tiene, pero el orden de los genes propios de la especie está conservado entre todos los aislamientos. Estos bloques de ADN se interrumpen por secuencias específicas de cada cepa que pueden ser de entre 1 a 200 kb<sup>28</sup>.

La secuencia de los genes comunes está altamente conservada entre los distintos aislamientos de esta bacteria, a excepción del gene *piliA* que codifica para la fimbria tipo IV y que presenta un gran polimorfismo. De hecho la variabilidad de las secuencias específicas de *P. aeruginosa* es 10 veces menor que la que presentan distintas cepas de *E. coli* o *Salmonella*, lo que sugiere una alta tasa de recombinación entre la población de esta bacteria. La alta frecuencia de recombinación entre las distintas clonas, comparada con la relativamente menor tasa de mutación espontánea, mantiene una información genética común a toda la especie.

---

<sup>27</sup> Römling, U., K. D. Schmidt, and B. Tummeler. 1997. Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J. Mol. Biol.* 271: 386-404.

<sup>28</sup> Liang, X. Op cit p. 18.

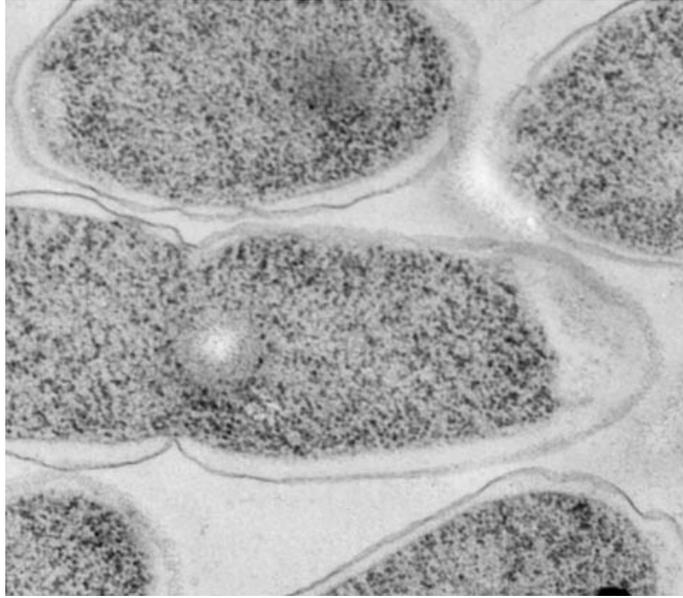


Fig. 3 Micrografía electrónica en la que se muestran las características microscópicas de las pseudomonas. En la parte oscura aparece el citoplasma con su contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y organelos. En el centro se observa el núcleo como una estructura de condensación.

*P. aeruginosa* tiene una parte de su genoma altamente conservada y una proporción menor, pero significativa, que es distinta en cada clona de esta bacteria. En una alta proporción de aislamientos clínicos (18 cepas), existe una secuencia de cerca de 49 kb que no está presente en la cepa PAO1.

La alta conservación entre cepas de la mayor parte del genoma de *P. aeruginosa*, aunada a la presencia de genes clona específicos, podría explicar la capacidad de esta bacteria de colonizar tan diversos nichos y de utilizar como sustrato una gran variedad de compuestos. En un determinado nicho ecológico toda la población bacteriana puede explotar toda la información genética propia de la especie y, al mismo tiempo, cada clona contiene secuencias propias que son blanco de una acelerada evolución genética.

### **2.3 Plásmidos**

Una de las características de las bacterias del género *Pseudomonas* es su gran capacidad para catabolizar distintos hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Esta característica generalmente está codificada en plásmidos, llamados catabólicos, que casi siempre se encuentran en cepas de *P. putida* y rara vez en *P. aeruginosa*. En el caso de esta última bacteria su enorme versatilidad

metabólica parece deberse al gran número de genes cromosomales que codifican para enzimas con actividades novedosas. Los plásmidos que se presentan en *P. aeruginosa* codifican para resistencias a antibióticos o a metales, y su extensa distribución representa un problema clínico.

Los plásmidos que confieren resistencia a antibióticos y metales pesados entre los aislamientos de *P. aeruginosa*, no lo son tanto como para considerar que estos elementos genéticos formen parte de su genoma. Por otra parte, no existen datos que sugieran que los plásmidos tengan un papel en la alta tasa de recombinación que presenta esta bacteria <sup>29</sup>.

Algunos plásmidos originalmente aislados de cepas de *P. aeruginosa* fueron importantes para la construcción del mapa genético de esta bacteria. Además, ya que estos plásmidos pueden replicarse en distintos fondos genéticos, han sido utilizados en el estudio genético de distintas proteobacterias, diferentes a las enterobacterias. También tienen importancia dentro de la ingeniería genética pues a partir de ellos se han construido múltiples vectores de clonación capaces de replicarse en diversas bacterias.

#### **2.4 Resistencia natural a los antibióticos (ver anexo 3)**

La membrana externa de las bacterias gram-negativas es una membrana semipermeable, formada principalmente por el lipopolisacárido, que permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y tiene muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos. La permeabilidad de la membrana externa depende principalmente de las porinas, que son proteínas formadoras de poros con una baja especificidad, y de los sistemas de transporte específicos. La baja permeabilidad de las porinas de la membrana externa de *P. aeruginosa* tiene un papel importante en el alto nivel de resistencia natural a los antibióticos de esta bacteria <sup>30</sup>.

---

<sup>29</sup> Holloway, B. W. Op cit p. 18

<sup>30</sup> Govan, J. R. W. & V. Deretic 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev. 60: 539-574.



Fig. 4 Antibiograma de pseudomonas multirresistentes. Cada disco blanco representan pastillas de diferentes antibióticos colocados sobre el agar del medio de cultivo en donde se han desarrollado pseudomonas. Los círculos oscuros alrededor de las pastillas (halos de inhibición) significa inhibición del crecimiento de las bacterias. Las pastillas que no tienen halos de inhibición significan que esta bacteria es resistente a esos antibióticos.

En *P. aeruginosa*, tanto la resistencia a antibióticos intrínseca como la adquirida, dependen principalmente de la presencia de un gran número de transportadores que secretan estos compuestos al exterior de la célula. El mayor número de estos transportadores se agrupan en dos familias, según su parecido estructural, una de ellas está formada por los sistemas llamados eflux, y la otra se denomina MFS, por sus siglas en inglés (major facilitator superfamily).

Es notoria la gran abundancia de estos dos tipos de transportadores en el genoma de la cepa PAO1 comparado con el número encontrado en otras bacterias como *E. coli*. Los sistemas eflux están formados por tres proteínas, un intercambiador droga-protón, presente en la membrana interna, una proteína de membrana externa que parece formar un canal y una proteína periplásmica que une a las dos proteínas membranales.

El sistema eflux que más contribuye a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* es el sistema AcrAB/MexAB que es capaz de transportar una amplia variedad de antibióticos como: quinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim y b-lactámicos. Además de los antibióticos, el sistema

AcrAB/MexAB también puede translocar solventes orgánicos, así como al autoinductor sintetizado por la enzima LasI (anexo 2)<sup>31</sup>.

## 2.5 “Sistema Sensor de Quórum”

*P. aeruginosa*, al igual que otras bacterias cuenta con múltiples sistemas regulatorios que le permiten modificar la expresión de distintos genes en respuesta de cambios en el medio ambiente. Uno de estos sistemas regulatorios, que también está presente en muchas otras bacterias, responde no directamente a las condiciones medio ambientales, sino fundamentalmente a cambios en una población bacteriana, ya que promueve el cambio en la expresión genética en función de la densidad celular. Este sistema regulatorio detecta cuándo se ha llegado a una masa crítica de bacterias por lo que se le ha denominado “sensor de quórum”.

El mecanismo mediante el cual se regula la expresión genética en altas densidades celulares se basa en la producción baja y constante por cada célula de un compuesto difusible llamado autoinductor. Cuando el número de células llega a cierto umbral en el que la concentración del autoinductor es suficientemente elevada, este compuesto interacciona y activa a cierto activador transcripcional que, a su vez, cambia el patrón de expresión génica<sup>32</sup>. En un gran número de proteobacterias los autoinductores son derivados acilados de las lactonas de homoserina.

*P. aeruginosa* contiene más de un sistema “sensor de quórum” y produce múltiples autoinductores. Dos de estos sistemas denominados Las y Rhl, han sido muy bien caracterizados a nivel molecular, sin embargo, existe un tercer regulador transcripcional de la familia de los activadores de la respuesta sensora de quórum llamado QscR, que a diferencia de los otros dos sistemas mencionados, tiene un papel negativo en la regulación de la respuesta sensora de quórum. QscR forma multímeros consigo mismo en presencia de los

---

<sup>31</sup> Maseda, H. M. Kitao, S Eda, E. Yoshihara & T. Nakae. 2002. A novel assembly process of multicomponent xenobiotic efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 46: 677-685.

<sup>32</sup> Fuqua W. C. M. R. Parsek and E. P. Greenberg. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annu. Rev. Genet. 35: 439-468.

autoinductores y también oligomeriza con RhlR y LasR, de modo que a través de esta interacción ejerce su papel como represor de la respuesta sensora de quórum<sup>33</sup>.

Los sistemas Las y Rhl participan de una manera central en la expresión de los genes que tienen que ver con la virulencia de *P. aeruginosa*. Estos dos sistemas reguladores interactúan entre sí de una manera muy compleja para promover la expresión de los genes involucrados en la patogénesis de *P. aeruginosa*. Algunos elementos en la secuencia de los promotores que participan en la determinación de que un gene sea regulado por uno de estos sistemas y no por el otro, sin embargo aún no se entienden totalmente, de modo que sabiendo la secuencia de los elementos regulatorios no se puede predecir cuál será el patrón de regulación<sup>34</sup>.

El sistema “sensor de quórum” basado en el activador transcripcional LasR promueve la transcripción de distintas proteasas involucradas en la virulencia de esta bacteria como son las elastasas A y B y la proteasa alcalina, así como la exotoxina S. El autoinductor con el que interacciona LasR es el *N*-(3-oxidodecanoil) - homoserina lactona, o 3-o-C12-HSL, que se sintetiza por la reacción catalizada por la enzima sintetasa del autoinductor LasI. LasR acoplada con 3-o-C12-HSL activa a su vez la transcripción del gen *lasI* y de los que codifican para RhlR y RhlI, por lo que los dos sistemas “sensor de quórum” forman una cascada regulatoria encabezada por LasR<sup>35</sup>.

El autoinductor con el que interacciona RhlR es el *N*-(butanoil)-homoserina lactona, o C4-HSL que es producido por la autoinductora sintetasa RhlI. La proteína RhlR unida a C4-HSL promueve la transcripción de los genes (*rhlAB* y *rhlC*) que codifican para las enzimas ramnosiltransferasa 1 y

---

<sup>33</sup> Ledgham, F., I. Ventre, C. Soscia, M. Foglino, J. N. Sturgis and A. Lazdunski. 2003. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol.* 48: 199-210.

<sup>34</sup> De Kievit, T., Y. Kakai, K. Register, E. C. Pesci & B. H. Iglewski 2002. Role of the *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in *rhlI* regulation. *FEMS Microbiol. Lett.* 212: 101-106.

<sup>35</sup> Pearson, J. P., E. C. Pesci, & B. H. Iglewski 1997 Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis. *J Bacteriol.* 179: 5756-5767.

ramnosiltransferasa 2 que participan en la producción del biosurfactante ramnolípido.

Otros metabolitos que participan en la virulencia de la bacteria, como la piocianina, están también bajo el control del sistema Rhl. Algunos de los productos de los genes regulados por el sistema Rhl, como los ramnolípidos y la piocianina sólo se expresan en ciertas condiciones de cultivo, como pueden ser condiciones de limitación de ciertos nutrientes, como el fosfato o el nitrógeno en el caso de los ramnolípidos. De modo que en un medio rico, aun en altas densidades celulares, no se expresan estos factores regulados por RhIR<sup>36</sup>.

Asimismo durante el crecimiento exponencial no se transcriben por lo menos algunos de los genes activados por RhIR, como el operón *rhlAB*, aunque RhIR y C4-HSL estén presentes. Aún no se conocen los sistemas reguladores que determinan la expresión diferencial del sistema Rhl dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y la fase de crecimiento, sin embargo se sabe que el gene *rhIR* tiene una regulación transcripcional muy compleja. Este gene presenta 4 inicios de transcripción y en su expresión participan múltiples reguladores, además de LasR/3-o-C12-HSL<sup>37</sup>.

Una característica particular del sistema Rhl es que puede actuar como activador de la transcripción del promotor del operón *rhlAB* cuando está unido a C4-HSL y como represor cuando se encuentra libre, uniéndose a la misma secuencia operadora. En el caso de LasR, sin embargo sólo se dimeriza y se une a su secuencia blanco en el DNA cuando se encuentra acoplado a 3-o-C12-HSL. Asimismo RhIR, en ausencia de C4-HSL, reprime la expresión del gene *lasB* que codifica para la elastasa que es proteasa más abundante, y es activado por LasR, y parece actuar como represor de la expresión de su propio gene.

---

<sup>36</sup> Ochsner, U. A., K. Koch, A. Fietcher, & J. Reiser 1994 Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 176: 2044-2054.

<sup>37</sup> Medina, G., Juárez, K., and Soberón-Chávez G., 2003b, The *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* operon is not expressed on the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer *N*butanoyl-homoserine lactone. J. Bacteriol. 185: 377-380.

RhIR forma dímeros tanto en presencia como en ausencia de C4-HSL, lo que concuerda con que pueda unirse al ADN aun sin el autoinductor y que pueda activar o reprimir genes. En un análisis reciente del transcriptoma de *P. aeruginosa* para evaluar la respuesta sensora de quórum se reportó que esta respuesta regula la expresión, ya sea por activación o por represión de cientos de genes. Se calcula que aproximadamente el 6% del genoma de esta bacteria se regula por este sistema.

La expresión genética se ve afectada, principalmente al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, pero no exclusivamente en esta etapa, sino que puede ocurrir a todo lo largo de la curva de crecimiento. También se hizo patente que las condiciones ambientales modulan de una manera muy importante a este sistema, de modo que apenas empezamos a entender la gran complejidad de este regulón y la importancia que tiene en la virulencia y en la adaptación de *P. aeruginosa* a su ambiente<sup>38</sup>.

## 2.6 Virulencia en plantas e invertebrados

En *P. aeruginosa* el aislamiento clínico PA14 es capaz de infectar a la planta *Arabidopsis thaliana*, y además utiliza factores de virulencia comunes para infectar a esta planta y al ratón, que es un modelo animal empleado. La cepa PA14 también es capaz de infectar al gusano *Caenorhabditis elegans*<sup>39</sup>.

## 2.7 Fisiología y estructura

Las Pseudomonas son bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvados (0,5 a 1,0 x 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$ ) con flagelos polares que las hacen móviles. Estos microorganismos no son fermentadores, utilizando los hidratos de carbono a través del metabolismo respiratorio en el que el oxígeno es el aceptador terminal de electrones. Aunque se definen como aerobios estrictos, pueden

---

<sup>38</sup> Ventre, I., F. Ledgham, V. Prima, A. Lazdunski, M. Foglino and J. N. Sturgis. 2003. Dimerization of the quorum sensing regulator RhIR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. Mol. Microbiol. 48: 187-198.

<sup>39</sup> Tan M.-W. & F. M. Ausubel. 2000. *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Curr. Opin. Microbiol. 3: 29-34.

crecer de forma anaerobia utilizando nitrato o arginina como aceptador terminal de electrones.

La presencia de citocromo oxidasa en las especies de *Pseudomonas* se utiliza para distinguirlas de las enterobacterias. Algunas cepas tienen un aspecto mucoso por la abundancia de polisacáridos de la cápsula; estas cepas son especialmente frecuentes en los pacientes con fibrosis quística. Algunas producen pigmentos difusibles (p. Ej., piocianina [azul], fluoresceína [amarillo], piorrubina [marrón]).

Aunque el género estuvo formado en otros tiempos por numerosas especies, la mayoría de ellas se han reclasificado en otros géneros (p. Ej., *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*). Este género consiste ahora en unas 10 especies que se han aislado de las muestras clínicas, siendo *P. aeruginosa* la más frecuente.

## **2.8 Patogenicidad**

Los procesos infecciosos de la patogenicidad tienen tres etapas:

- a) Unión y colonización bacteriana (se unen por Pili o fimbrias al epitelio respiratorio, células bucales, traquea dañada o mucina traqueobronquial)
- b) Invasión local (enzimas)
- c) Diseminación e invasión sistémica (toxinas).

Dentro de la gran variedad de patologías que produce se encuentran: endocarditis de válvula nativa y protésicas, intrahospitalaria, meningitis, septicemia en neutropénicos y quemados.

Las pseudomonas poseen una estructura celular envolvente que libera toxinas y enzimas. Posee distintos componentes y cada uno de ellos tiene propiedades virulentas distintas sobre los mecanismos defensivos del hospedero: (ver anexo 3)

- Adhesina: Mecanismo de unión a las células del huésped

- Exotoxina A: Inhibe la síntesis proteica en las células hepáticas, corazón, riñón, pulmón y bazo. Inhibe la captación de aminoácidos a nivel celular.
- Citotoxina: Actúa sobre la mayoría de las células eucarióticas, produciendo desorden en las membranas y una baja de sus efectos bactericidas.
- Exotoxina B: Contribuyen a la patogenicidad.
- Enzimas:

Elastasa: Actúa en las células de las paredes arteriales.

Colagenasa: Produce infección en la cornea

La exotoxina A es uno de los factores de virulencia más importantes producidos por las cepas patógenas de *P. aeruginosa*. Esta toxina bloquea la síntesis de proteínas en las células eucariotas de un modo similar a como lo hace la toxina diftérica que es producida por *Corynebacterium diphtheriae*. Sin embargo, las exotoxinas producidas por estos dos microorganismos son estructural e inmunológicamente diferentes, y la exotoxina A es menos potente que la toxina diftérica<sup>40</sup>. La exotoxina A probablemente contribuya a la dermatonecrosis que ocurre en las quemaduras, al daño corneal de las infecciones oculares, y al daño tisular de las infecciones pulmonares crónicas. La toxina es también inmunodepresora<sup>41</sup>.

### **2.8.1 Exoenzimas S y T**

Las exoenzimas S y T son toxinas extracelulares producidas por *P. aeruginosa*. Poseen una actividad adenosina difosforribosiltransferasa, cuya función no está clara. Sin embargo, cuando las proteínas son introducidas en sus células eucariotas diana por el sistema de secreción tipo III, se produce un daño en las células epiteliales, lo que facilita la diseminación de las bacterias, la invasión

---

<sup>40</sup> Bouza E, García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Díaz MS. Pseudomona aeruginosa: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. Antimicrobial Agents and chemotherapy. 1999, 43: 981-2.

<sup>41</sup> Ibid. P. 28.

tisular y la necrosis. Esta citotoxicidad está mediada por una reorganización de la actina<sup>42</sup>.

### **2.8.2 Elastasas**

Dos enzimas, LasA (serín proteasa) y LasB (metaloproteasa de zinc) actúan de manera sinérgica para degradar la elastina, lo que da lugar al daño de los tejidos que contienen elastina, y a la producción de daño en el parénquima pulmonar y de lesiones hemorrágicas (ectima gangrenoso) que se asocian con las infecciones diseminadas por *P. aeruginosa*. Estas enzimas degradan también los componentes del complemento e inhiben la quimiotaxis y la función de los neutrófilos, lo que provoca una mayor diseminación y daño tisular en las infecciones agudas. Las infecciones crónicas por *Pseudomonas* se caracterizan por la formación de anticuerpos frente a LasA y LasB, depositándose los inmunocomplejos en los tejidos infectados.

### **2.8.3 Proteasa alcalina**

Al igual que las elastasas, la proteasa alcalina contribuye a la destrucción tisular y a la diseminación de *P. aeruginosa*. También interfiere con la respuesta inmune del huésped.

### **2.8.4 Rhamnolípidos**

*P. aeruginosa* produce dos glucolípidos similares a detergentes llamados rhamnolípidos. El monorrhamnolípidos es una rhamnosa enlazada con un dímero del ácido hidroxidecanoico beta, y el dirhamnolípidos es un dímero de rhamnosa enlazado con uno de esos dímeros. Se cree que los rhamnolípidos contribuyen a la capacidad de *P. aeruginosa* para ocasionar infecciones pulmonares. Inhiben la actividad de los cilios respiratorios, estimulan la secreción de mucina, matan a los macrófagos derivados de monocitos, inhiben la fagocitosis de los macrófagos y alteran el transporte epitelial de iones<sup>43</sup>.

---

<sup>42</sup> Bouza E, García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Díaz MS. *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, 43: 981-2.

<sup>43</sup> *Ibid.* P. 30.

### 2.8.5 Citotoxina

La citotoxina (CTX) originalmente se llamaba leucocidina por su capacidad para matar polimorfonucleares (PMN). La CTX es una proteína de 29 kD codificada sobre el genoma del fago PCTX, cuyo gen se introduce a *P. aeruginosa* mediante conversión de fago. La CTX se sintetiza como prototoxina y se libera por bacteriolisis; se transforma en su forma activa cuando las proteasas extracelulares la rompen. La CTX se enlaza con las membranas de la célula huésped, forma huecos de 1 nm en la membrana y desestabiliza el intercambio iónico<sup>44</sup>.

### 2.8.6 Alginato

El alginato es la sustancia que constituye la capa gelatinosa que se observa sobre las cepas de *P. aeruginosa* que causan infecciones pulmonares crónicas en sujetos con fibrosis quística. El alginato está compuesto por ácido D-manurónico y su epímero 5', el ácido L-glucurónico.

El alginato es necesario para la persistencia de esta bacteria en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística. Aunque sólo 0.8 a 2.0% de todas las infecciones por *Pseudomonas* se debe a las cepas mucoides de *P. aeruginosa*, 80 a 90% de los pacientes con fibrosis quística presenta infecciones pulmonares por cepas de estas bacterias productoras de alginato<sup>45</sup>.

### 2.8.7 Fosfolipasa C

*P. aeruginosa* produce dos formas de fosfolipasa C (PLC). La PLC de alto peso molecular es hemolítica (PLC-H), mientras que la PLC de bajo peso molecular es no hemolítica (PLC-N). La síntesis de PLC-H y PLC-N se estimula de 8 a 30 veces respectivamente cuando los niveles ambientales de carbohidratos son altos y los niveles de fosfato inorgánico (Pi) son bajos. Estas proteínas forman

---

<sup>44</sup> Zinser, Joklik, Willet, Amos, Wilfert. Microbiología. Buenos Aires: Panamericana 1996: 785-94.

<sup>45</sup> Harris AD, Perencevich E, Roghmann MC, Morris G, Kaye K, Johnson J. Risk Factors for Piperacillin-Tazobactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalizes patients. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 2002, 46: 854-8.

parte de un grupo grande de genes bajo control coordinado dentro del regulón Pi.

La PLC-H y la PLC-N degradan la fosforilcolina, que es el constituyente principal de la sustancia tensoactiva pulmonar. La degradación de la fosforilcolina libera diacilglicerol y colina, produce atelectasia, estimula más síntesis de PLC-H y conduce a la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Estos productos del metabolismo de araquidonato tal vez contribuyan a los cambios patológicos que ocurren en los pulmones de sujetos con fibrosis quística e infección pulmonar crónica por esta bacteria. Los principales productos de la actividad de PLC también son osmoprotectores y es probable que protejan a la bacteria de la presión osmótica elevada que está presente en los pulmones de estos pacientes <sup>46</sup>.

## 2.9 Resistencia a antibióticos

*P. aeruginosa* es inherentemente resistente a muchos antibióticos y puede mutar a cepas aún más resistentes durante el tratamiento. Aunque se han identificado numerosos mecanismos de resistencia, la mutación de las porinas constituye el principal mecanismo de resistencia. La penetración de los antibióticos en la célula pseudomónica se produce principalmente a través de los poros de la membrana externa. Si las proteínas que forman la pared de estos poros se alteran para restringir el flujo a través de los canales, se puede desarrollar resistencia a muchos tipos de antibióticos, así mismo se sabe que produce diferentes B-lactamasas que inactivan muchos antibióticos B-lactámicos (p. Ej., penicilinas, cefalosporinas, carbapenems) <sup>47</sup>.

Con respecto a los antibióticos beta-lactámicos la resistencia se basa principalmente en la combinación de impermeabilidad de la membrana externa (por alteración de diversas porinas) con la producción de cefalosporinasa

---

<sup>46</sup> Hisham Z, Finch RG. Resistencia antibiótica en el año 2000. Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica 2001, 19: 91-3.

<sup>47</sup> Klepser ME, Marangos MN, Zhu DP, Nicolau DP, Quintiliani R, Nightingale CH. Comparison of the bactericidal activities of Piperacilin-Tazobactam, Ticarcilin-Clavulanate, Ampicilin-Sulbactam against Clinical isolates of Bacteroides fragilis, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and chemotherapy 1997, 41: 435-9.

cromosómica inducible; en menor medida contribuyen las betalactamasas de origen plasmídico. Además de las enzimas inactivantes y la disminución en la acumulación de las drogas por alteración de la permeabilidad de las membranas (impermeabilidad y eflujo), puede presentar modificaciones del sitio blanco del antimicrobiano<sup>48</sup>.

## 2.10 Epidemiología

Las pseudomonas son patógenos oportunistas presentes en una gran variedad de ambientes. La capacidad para aislar a estos microorganismos de las superficies húmedas puede estar limitada solamente por los esfuerzos para buscar los microorganismos. Tienen unos requerimientos nutricionales mínimos, pueden tolerar un amplio rango de temperaturas (4 - 42 °C), y son resistentes a muchos antibióticos y desinfectantes. De hecho, la recuperación de pseudomonas del ambiente (p. Ej., la pila o el suelo de un hospital) tiene un escaso significado a no ser que haya una evidencia epidemiológica de que el lugar contaminado sea un reservorio de la infección<sup>49</sup>.

Además, el aislamiento de estas bacterias de un paciente hospitalizado es un motivo de preocupación, pero normalmente no justifica la intervención terapéutica, a no ser que exista evidencia de enfermedad. La recuperación de este tipo de bacterias, particularmente de especies diferentes, de una muestra clínica, puede tratarse de una mera colonización del paciente o de una contaminación ambiental de la muestra durante la recogida o el procesamiento en el laboratorio<sup>50</sup>.

Debido a la severidad de las infecciones provocadas por este germen, resulta necesario instaurar un tratamiento empírico con antimicrobianos que posean alto nivel de eficacia, dentro de los cuales aparece como alternativa la

---

<sup>48</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997, 17: 234-8.

<sup>49</sup> Soloaga R, Tokumoto A, Fernández M, Borga CA, Argüello ZG. Revision de los mecanismos de resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a diversas familias de antibióticos. *Infectología y Microbiología Clínica* 1996, 8: 57-63.

<sup>50</sup> Soloaga R, Tokumoto A, Fernández M, Borga CA, Argüello ZG. *Pseudomona aeruginosa* con disociación en la CIM de imipenem y meropenem. *Infectología y Microbiología Clínica* 1996, 8: 64-65.

combinación de un betalactámico con un inhibidor de betalactamasas como es el caso de Piperacilina/Tazobactam <sup>51</sup>.

## **2.11 Síndromes clínicos**

### **2.11.1 Infecciones pulmonares**

Las infecciones del tracto respiratorio inferior por *P. aeruginosa* pueden variar en gravedad desde una colonización asintomática o una traqueobronquitis benigna hasta una bronconeumonía necrotizante grave. La colonización se ve en pacientes con fibrosis quística, otras enfermedades pulmonares crónicas, y en pacientes neutropénicos. Las infecciones en pacientes con fibrosis quística se han asociado con la exacerbación de la enfermedad de base, así como con una enfermedad pulmonar invasiva. Las cepas mucoides son las que se suelen aislar en las muestras de estos pacientes, y son difíciles de erradicar con tratamiento antibiótico <sup>52</sup>.

Las circunstancias que predisponen a los pacientes inmunodeprimidos a las infecciones por pseudomonas son: a) el tratamiento previo con antibióticos de amplio espectro que alteran la población bacteriana protectora normal, y b) el uso de respiradores, que pueden introducir el microorganismo en el tracto respiratorio inferior. La enfermedad invasiva en esta población se caracteriza por una bronconeumonía bilateral difusa con la formación de microabsesos y la necrosis de los tejidos. La tasa de mortalidad es tan elevada como el 70%<sup>53</sup>. En diferentes estudios realizados en hospitales de Guatemala, las pseudomonas han sido encontradas en alrededor del 17% de 22 diferentes tipos bacterianos estudiados, en pacientes que desarrollaron neumonía nosocomial<sup>54</sup>.

---

<sup>51</sup> Soloaga R. Revista Argentina de Microbiología 2000, 32: 149-52.

<sup>52</sup> [www.bioq.unizar.es/departamento/docencia/gentica%20molecular.htm](http://www.bioq.unizar.es/departamento/docencia/gentica%20molecular.htm)

<sup>53</sup> Zinser, Joklik, Willet, Amos, Wilfert. Microbiología. Buenos Aires: Panamericana 1996: 785-94.

<sup>54</sup> López RA. Sensibilidad de bacterias aisladas en pacientes con neumonía nosocomial a los antibióticos. 1998. Tesis Facultad de Ciencias Médicas, USAC.



Fig. 5 Infección de faringe por pseudomonas. Se observa un proceso inflamatorio en todas las paredes con producción de exudado mucopurulento.

### 2.1.1.2 Infecciones cutáneas primarias

*P. aeruginosa* produce varias infecciones cutáneas. Las infecciones mejor conocidas son las infecciones de las quemaduras. La colonización de una quemadura, seguida de un daño vascular localizado, necrosis tisular, y finalmente bacteriemia, es frecuente en los pacientes con quemaduras graves. La superficie húmeda de la quemadura y la falta de respuesta de los neutrófilos a la invasión tisular predisponen a los pacientes a estas infecciones. El tratamiento de las heridas con cremas de antibióticos tópicos sólo ha tenido un éxito limitado en el control de estas infecciones. Las Infecciones de las quemaduras y otras infecciones cutáneas y de los tejidos blandos pueden poner en riesgo la vida <sup>55</sup>.

La foliculitis es otra infección frecuente producida por estas bacterias, la cual se produce por la inmersión en agua contaminada (p. ej., baños calientes, remolinos, piscinas). Las infecciones secundarias por este tipo de bacterias pueden ocurrir también en los individuos que tienen acné o que se depilan las piernas. Por último, se ha encontrado que estas bacterias desarrollan infecciones cutáneas en los individuos que tienen las manos expuestas con frecuencia al agua.

---

<sup>55</sup> Harris AD, Perencevich E, Roghmann MC, Morris G, Kaye K, Johnson J. Risk factors for Piperacillin-Tazobactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 2002, 46: 854-8.

### 2.1.1.3 Infecciones del tracto urinario

La infección del tracto urinario aparece principalmente en los pacientes con sondas urinarias de larga duración.

### 2.11.4 Infecciones de oídos

Las otitis externas se presentan desde lo que se conoce como “oído del nadador” hasta la otitis externa maligna o la otitis media crónica.



Fig. 6. Infección por pseudomonas en miembros inferiores. Se observa desarrollo de celulitis con destrucción masiva de tejidos y exposición de estructuras óseas.

### 2.11.5 Infecciones del sistema nervioso central

*P. aeruginosa* ocasiona meningitis y abscesos cerebrales en pacientes con defectos inmunológicos preexistentes o traumatismos en la cabeza. Los microorganismos se introducen al sistema nervioso central por traumatismos, diseminación hematógica o extensión directa a partir de infección auricular crónica o sinusitis. La meningitis por este tipo de bacterias a menudo se presenta en sujetos con cáncer y suele relacionarse con fiebre, cefalea, rigidez de la nuca (cuello tieso), confusión y otros signos neurológicos de meningitis. La enfermedad suele ser subaguda en ausencia de bacteriemia. Los individuos

con bacteriemia pueden presentar enfermedad fulminante acompañada de choque séptico<sup>56</sup>.

### **2.11.6 Infecciones auditivas**

*P. aeruginosa* causa otitis externa, una infección bastante benigna pero muy dolorosa que también se llama oído de nadador, porque con frecuencia infecta a los individuos que nadaron en agua caliente, como un estanque, o una fosa con grava. El canal auditivo, que se inflama en forma exagerada y contiene desechos, primero da comezón y el dolor se inicia después.

Los pacientes diabéticos de edad avanzada y los lactantes sufren una infección más peligrosa llamada otitis externa maligna. Dicha afección se caracteriza por invasión de los tejidos blandos, que en ocasiones produce necrosis, daños a los nervios craneales, bacteriemia y sepsis. Las manifestaciones características incluyen canal auditivo inflamado y doloroso, exudado purulento y granulación en la pared posteroinferior del canal. La afectación de un nervio craneal se detecta por parálisis facial, pero cualquiera de los nervios craneales puede afectarse. En algunos casos los pacientes se quejan de trismo y pérdidas auditivas, y otros presentan sepsis. Las tasas de mortalidad con tratamiento suelen ser de 15 a 20%<sup>57</sup>.

Esta bacteria también ocasiona otitis media en recién nacidos y es la causa más frecuente de otitis media supurativa crónica en niños y adultos. Las personas diabéticas pueden presentar mastoiditis, la cual suele ser secundaria a otitis externa maligna o a otitis media.

---

<sup>56</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997, 17: 234-8.

<sup>57</sup> Bouza E, García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Díaz MS. Pseudomonas aeruginosa: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999, 43: 981-2.

### 2.11.7 Infecciones oculares

Las Infecciones oculares ocurren después de un traumatismo inicial en la córnea, abrasiones por lentes de contacto, arañazo de la superficie ocular y la posterior exposición a pseudomonas en el agua contaminada.

*P. aeruginosa* ocasiona una ulceración fulminante de la córnea llamada queratitis. Como se mencionó antes, los factores de riesgo incluyen daño a la conjuntiva por infección de herpes simple, traumatismos o uso de lentes de contacto blandos. La infección se inicia con una pequeña úlcera en la córnea que crece con rapidez en forma concéntrica y produce dolor e inflamación del párpado. La epidermis y el estroma se necrosan y se recolecta exudado en la úlcera. El ojo se llena de pus (hipopión) y el funcionamiento ocular se pierde con rapidez. La queratitis por este tipo de bacterias es una urgencia médica porque las lesiones penetrantes causan panoftalmía, la cual destruye el ojo en pocas horas o días<sup>58</sup>.

### 2.11.8 Infecciones del aparato digestivo

Las infecciones del aparato digestivo por pseudomonas ocurren sobre todo en recién nacidos y pacientes inmunocomprometidos. Algunos recién nacidos padecen enterocolitis que ponen en peligro la vida. En pacientes con cáncer neutropénico las infecciones asintomáticas del intestino en ocasiones progresan a sepsis o infecciones ectópicas diseminadas, aunque también se presenta enterocolitis declarada<sup>59</sup>. En los pacientes con neutropenia y enterocolitis se observan lesiones hemorrágicas y necróticas en la mucosa intestinal. Se cree que la enfermedad pediátrica llamada fiebre de Shanghai, que es semejante a la fiebre tifoidea, también se debe a este tipo de bacterias.<sup>60</sup>

---

<sup>58</sup> Paramythiotou E, Lucet J-C, Timsit J-F, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Troulliet J-L, Belloc S, Kassis N, Karabinis A, Andremont A. Clin Infect Dis 2004; 38: 670-7.

<sup>59</sup> El factor subyacente más importante en estos casos, lo constituye la deficiencia inmunológica, la cual se manifiesta en el recién nacido como un sistema inmunológico inmaduro.

<sup>60</sup> Costerton, J. W. 1980 *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, p. 15-24. In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.

## Capítulo 3

### Procedimientos para el Procesamiento del ADN

#### 3.1 Secuenciación del DNA

Existen dos métodos generales para secuenciar el ADN, uno químico y uno enzimático. En los primeros días de la investigación sobre secuenciación, el método químico permitió obtener sorprendentes resultados iniciales, pero el método enzimático proporciona más información por experimento.

El procedimiento clásico de desciframiento de secuencias de ADN ha consistido en la lectura a ojo de placas autorradiográficas en las que aparecen escaleras discontinuas de líneas, resultantes de exponer estas placas a láminas de geles en donde se han separado fragmentos de ADN conteniendo trazadores radiactivos. La necesidad de adaptar tecnologías de secuenciación a costos y velocidades compatibles con proyectos de secuenciación de genomas completos, se ha traducido en el desarrollo de aparatos que permitan la lectura automatizada de geles.

En la actualidad estos aparatos ya no operan en base a trazadores radiactivos, sino que detectan señales de fluorescencia inducida por láser. El resultado es que se cuenta hoy con aparatos mucho más rápidos y precisos pero cuyo costo, calibración y mantenimiento sofisticado fuerza su operación en unidades de servicio ("core facilities") que son capaces de satisfacer las demandas de secuenciación de varios laboratorios <sup>61</sup>.

La secuenciación de ADN es una actividad imprescindible en la caracterización de nuevos genes o en la detección de mutaciones en genes conocidos que conducen a anomalías genéticas. Hasta hace poco esta actividad estaba circunscrita a unos pocos laboratorios que, además de contar con el aparataje electroforético en que esta técnica se basa, estuvieran en condiciones de

---

<sup>61</sup> [www.bioq.unizar.es/departamento/docencia/genetica%20molecular.htm](http://www.bioq.unizar.es/departamento/docencia/genetica%20molecular.htm)

manejar los sofisticados sistemas de clonaje que son necesarios como procesos previos para obtener un segmento de ADN secuenciable <sup>62</sup>.

Clave en la secuenciación de ADN ha resultado el desarrollo de una tecnología revolucionaria denominada PCR (Polymerase Chain Reaction) que permite reproducir selectivamente un fragmento de DNA hasta tener grandes cantidades de él. Esta tecnología ha permitido desarrollar un sinnúmero de aplicaciones analíticas muy concretas. La PCR también ha tenido un tremendo impacto en laboratorios que con recursos modestos pueden tener acceso a la secuenciación de ADN. Esto porque mediante PCR se pueden obviar las etapas de clonaje que eran antes requisito para tener material secuenciable. Con la ayuda de esta tecnología, puede usarse la secuenciación por ejemplo en diagnóstico de enfermedades genéticas.

### **3.1.1 Método químico**

Método de Maxam-Gilbert: A fines de la década de 1970, A. M. Maxam y W. Gilbert diseñaron el primer método para determinar las secuencias de fragmentos de ADN que contienen hasta 500 nucleótidos. Para ello se escinden químicamente, en distintos nucleótidos específicos, cuatro muestras de fragmentos de restricción de ADN con extremos radiactivos. Los subfragmentos obtenidos se separan por electroforesis en gel y los marcados se detectan mediante autorradiografía. Es posible determinar la secuencia del fragmento de restricción original, con extremos marcados, directamente por comparación con electroretrogramas paralelos de las cuatro muestras. <sup>63</sup>

### **3.1.2 Método enzimático**

Método de Sanger (Didesoxi): Fred Sanger y cols. desarrollaron un segundo método para determinar la secuencia de ADN y en la actualidad es mucho más usado que el método de Maxam-Gilbert. El método de Sanger también se denomina determinación de secuencia didesoxi, porque implica el uso de 2'-3'

---

<sup>62</sup> Cooper GM. La Célula. 2ª Ed. 2004. Editorial Marbán. España. Pp 111.

<sup>63</sup> Lodish, H y cols. Biología Celular y Molecular. 4ª Ed. 2002. Ed.MédicaPanamericana. España. Pp 267.

trifosfatos de didesoxinucleótidos (ddNTP), que carecen de un grupo hidroxilo 3'.

F. Sanger, investigador de la universidad de Cambridge (Inglaterra) es uno de los pioneros en la secuenciación de proteínas, él inventó en el año de 1977 el método de secuenciación de ADN llamado "interrupción de la cadena" o método didesoxi, (por el cual ganó el premio Nobel), el cual sigue siendo la base para la moderna tecnología de secuenciación automática.

El método de Sanger trataba de sintetizar una nueva cadena de ADN que fuera el complemento de una plantilla de una sola cadena, de manera que la identidad de la última letra estuviera determinada, es decir, el ADN es usado como una plantilla para generar un conjunto de fragmentos que difieren en longitud por una sola base, los fragmentos son separados en un gel por su tamaño y la secuencia se lee en una escala de bandas reactivas.

Además, Sanger incluyó un nucleótido didesoxi modificado. Esta base modificada se incorpora a la cadena de ADN sin ningún problema, pero no puede establecer un enlace con la siguiente base de la cadena, con lo que la cadena de ADN se ve interrumpida, este procedimiento se repite para los cuatro nucleótidos, con lo que se obtiene el conjunto de fragmentos de ADN.

Con el paso de los años, se ha ido refinando de tal manera que hoy día se ha convertido en un método automatizado que ha permitido secuenciar genomas enteros. En español se conoce con diversos nombres: método enzimático de terminación de cadena, método enzimático de Sanger, método didesoxi, secuenciación enzimática, método de los terminadores de cadena, método de secuenciación de ADN de Sanger, secuenciación didesoxi, método de secuenciación basado en el uso de terminadores de cadena (y variantes de los mismos) <sup>64</sup>.

El ADN monocatenario cuya secuencia se debe determinar sirve como hebra patrón para la síntesis de ADN in vitro; como iniciador se utiliza un oligodesoxinucleótido sintético con marca en el extremo 5'.

---

<sup>64</sup> [www.fondef.cl/bases/fondef/PROYECTO/97/F/D97F1036.HTML](http://www.fondef.cl/bases/fondef/PROYECTO/97/F/D97F1036.HTML)

Se realizan cuatro reacciones de polimerización separadas, cada una con baja concentración de uno de los cuatro ddNTP, además de concentraciones más elevadas de los trifosfatos de desoxinucleótidos normales (dNTP). En cada reacción se incorpora ddNTP al azar en las posiciones del correspondiente dNTP; esta adición de ddNTP inhibe la polimerización, porque la ausencia de un hidroxilo 3' impide el agregado del próximo nucleótido. La mezcla de fragmentos terminados provenientes de cada una de las cuatro reacciones se somete a electroforesis en gel paralelas; luego los fragmentos separados se detectan por autorradiografía.

En el autorradiograma obtenido se visualiza directamente la secuencia de la hebra patrón de ADN original. Sobre la base de la determinación de la secuencia de un fragmento de ADN particular clonado es posible sintetizar, por medios químicos, los iniciadores de los fragmentos superpuestos. Por lo tanto, la secuencia de una larga porción continua de ADN se puede determinar mediante la secuencia individual de los fragmentos superpuestos de los ADN clonados que la componen.<sup>65</sup>

La secuenciación del ADN en el método enzimático se basa en la capacidad de replicar ADN in vitro con el fragmento de Klenov de la ADN polimerasa 1. La replicación del ADN requiere copiar una molécula de ADN de una sola hebra, que se conoce como molde. Un pequeño tramo de ADN conocido como cebador se hibridiza al molde para alargar el cebador. Finalmente, todas las cadenas terminarán en una mezcla de reacción. Puede haber cientos de miles de moléculas recién sintetizadas.

Las probabilidades son que cuando menos una -casi siempre muchas- terminará cada vez que aparece una adenina: se ha producido un conjunto de fragmentos de longitud creciente. Lo mismo puede decirse de las mezclas de reacción para las otras tres bases. Cada una habrá producido un conjunto de fragmentos que terminan en un tipo particular de nucleótido<sup>66</sup>.

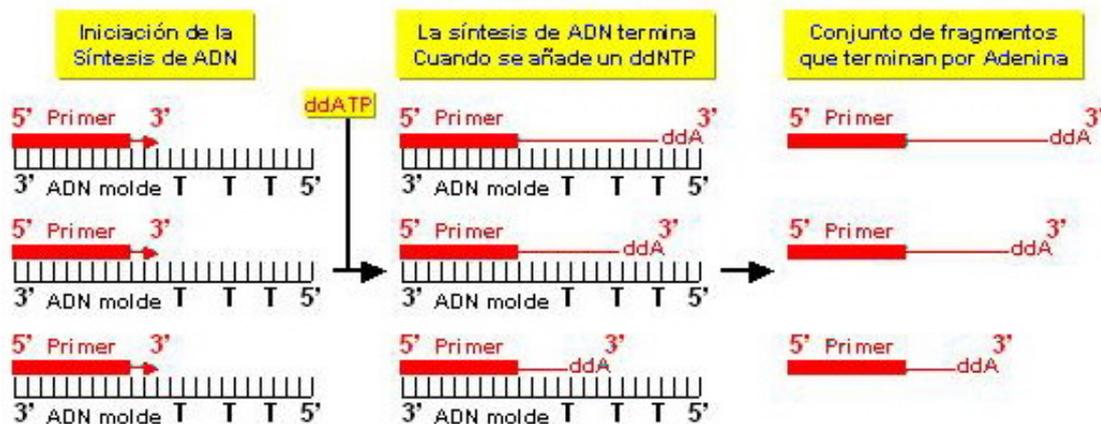
---

<sup>65</sup> <http://www.medtrad.org/biblioteca/referencia/glosario/E.html>

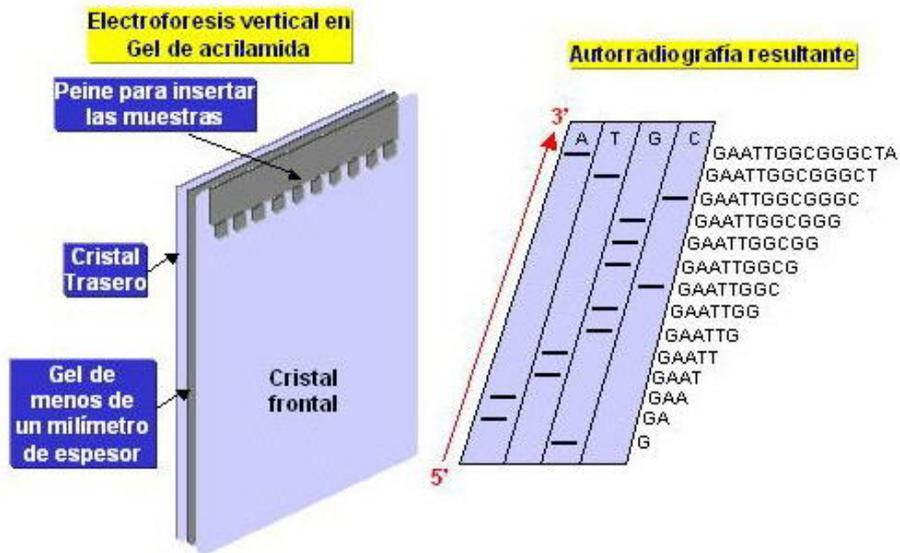
<sup>66</sup> [www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit10-/MolMarkers\\_es/PDF/VOL1/IV.5.pdf](http://www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit10-/MolMarkers_es/PDF/VOL1/IV.5.pdf)

Así como los fragmentos de ADN pueden separarse según su tamaño por electroforesis en gel de agarosa, también pueden separarse por electroforesis en gel de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida tienen un poder de resolución mucho mayor que la agarosa, en particular para los fragmentos cortos de ADN, de modo que pueden separarse dos moléculas de ADN cuya longitud difiere sólo en una base. Las cuatro mezclas de reacción se cargan en un gel de poliacrilamida muy delgado en cuatro pistas adyacentes y a continuación se separan por electroforesis los fragmentos de DNA. Los fragmentos más pequeños se mueven más rápidamente a través del gel.

Cuando se separan todos los fragmentos, el gel se seca y los fragmentos se detectan exponiendo un trozo de película de rayos X a los fragmentos radiactivos de ADN (autorradiografía). La secuencia de ADN puede leerse fácilmente en la película de rayos X revelada.<sup>67</sup>



<sup>67</sup> [www.ucm.es/.../practicass/sequencia/Secuencia.htm](http://www.ucm.es/.../practicass/sequencia/Secuencia.htm)



Figs. 7 y 8. Secuenciación idealizada de ADN en gel. La velocidad de migración de los fragmentos de ADN es inversamente proporcional al logaritmo de su  $M$ , por lo que hay una mayor dispersión en las bandas en la parte de abajo del gel. La identificación de la base terminal de cada molécula y su secuencia aparecen a la derecha.

Actualmente se desarrollan secuenciadores de ADN automatizados que pueden secuenciar miles de bases en un día. Estos adelantos son parte del inmenso trabajo que mundialmente se realizó para secuenciar el genoma humano completo que consta de tres mil millones de pares de bases aproximadamente.

El resultado de la secuenciación del ADN tiene múltiples aplicaciones para la investigación en áreas relacionadas con medicina, veterinaria y agricultura. Algunas de las aplicaciones son:

- El estudio de genes y sus mutaciones.
- Secuenciación de genomas y plásmidos bacterianos.
- Estudio de las bases moleculares de múltiples fenómenos biológicos, como la resistencia bacteriana o el estudio de enfermedades hereditarias humanas.
- Estudio de la variación genética implicada en el metabolismo de fármacos.
- En la agricultura, incluyen los estudios filogenéticos de especies vegetales y la resistencia a herbicidas.

- En veterinaria, apoya la búsqueda de nuevos marcadores genéticos.

### **3.1.3 Otros métodos de secuenciación:**

Durante décadas los biólogos han buscado un método para descodificar el ADN más barato y que pudiera ser miniaturizado, para poder estimular así nuevas aplicaciones como las médicas. Hasta el momento la técnica empleada ha sido la que diseñó Frederick Sanger en 1977, capaz de leer 67.000 bases cada hora.

#### **3.1.3.1 Método del escopetazo**

James Weber, director de la Marshfield Research Foundation de Wiscconsin, alrededor del año de 1993 empezó a trabajar en un método de secuenciación que no necesitara del tedioso proceso de localizar y secuenciar fragmentos previamente ordenados de cada cromosoma, es decir que se pudiera secuenciar cualquier genoma sin la necesidad de realizar mapas cromosómicos previos. El método de Weber llamado "El método del escopetazo" rompe todo el ADN de un genoma, luego se secuencian estos fragmentos y por último con poderosos medios informáticos se ensambla la secuencia. Los algoritmos para ensamblar la secuencia fueron diseñados por Gen Myers investigador de la universidad de Arizona en Tucson.<sup>68</sup>

Este método ha sido utilizado con mucho éxito por la empresa privada Celera Genomics, fundada por Craig Venter, para secuenciar el genoma humano, esta empresa además ha secuenciado completamente el genoma de la mosca de la fruta.

---

<sup>68</sup> <http://www.unileon.es/investigacion/ltiir/saan.htm>

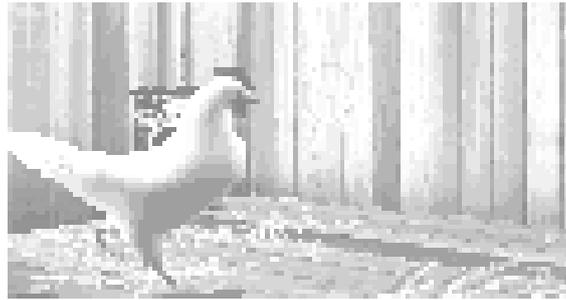


Fig. 10. Representación simbólica del método del escopetazo que consiste en la fragmentación del ADN en un solo paso, para su análisis y secuenciación.

### 3.1.3.2 Método 454

La compañía Life Sciences (EEUU) ha desarrollado una nueva tecnología que permite descodificar el ADN de forma más rápida y económica. El nuevo método, que difiere del empleado para descifrar el código genético humano publicado en 2001, supondrá en un futuro cercano que los tratamientos se adecuen al genoma de cada persona.

El método 454 mejora la pirosecuenciación ideada por Pal Nyman y Mostafa Ronaghi y se basa en la química de las luciérnagas. Cada vez que una unidad de ADN —base- es correctamente analizada, se genera un haz de luz y es detectado por un ordenador capaz de reconstruir la secuencia de nucleótidos.

"Lo que han hecho es muy significativo", declaró el doctor Ronaghi al diario 'The New York Times'. "Nosotros diseñamos la química y ellos han hecho el sistema práctico". "Este es el primer paso para una secuenciación del genoma humano por 1.000 dólares".<sup>69</sup>

El primer Sistema de Secuenciación 454 fue instalado en el Instituto de Secuenciación y Análisis del Genoma, un programa conjunto del Instituto Tecnológico de Massachussets, la Universidad de Harvard y el Instituto Whitehead de Investigación Biomédica.

Hasta el momento sólo se ha secuenciado el genoma de pequeñas bacterias. En 2003 la compañía informó que había descifrado el código genético de un

<sup>69</sup> <http://www.medtrad.org/biblioteca/referencia/glosario/E.html>

adenovirus en un solo día y recientemente anunció la descodificación del ADN de la bacteria que provoca la tuberculosis, en un intento por encontrar nuevos tratamientos para esta enfermedad.

De momento, el Sistema 454 supone una pequeña ventaja en la actual secuenciación del genoma de un paciente, pero en la medicina del futuro, la documentación completa del ADN indicará el tratamiento más adecuado en cada caso <sup>70</sup>.

La nueva tecnología evita los problemas del método Sanger, en el que algunos fragmentos de ADN no podían copiarse en el interior de bacterias, por lo que quedaban huecos por descifrar. Con la nueva técnica, cada fragmento de ADN es capturado de forma individual en una gota de líquido y amplificado a 10 millones de copias por medio de PCR.

Estas copias se unen a pequeñas burbujas que son introducidas en los pocillos de una placa metálica con forma de panal. Cada vez que se añade una base correcta a la hélice de ADN, en la reacción se libera una molécula de fósforo (pirofosfato).

En el interior de estos pocillos se coloca, además de las burbujas, cierta cantidad de la enzima luciferasa -empleada por las luciérnagas- que al entrar en contacto con el fósforo genera un haz de luz que indica la secuencia genómica en ese punto.

La máquina presenta también aún limitaciones, ya que por el momento sólo es capaz de leer fragmentos de una longitud igual o menor a 100 unidades, muy por debajo de las 800 unidades que permite la tecnología basada en el método Sanger. Esto dificulta el reensamblaje de las partes en el genoma completo.

---

<sup>70</sup> [www.fondef.cl/bases/fondef/PROYECTO/97/F/D97F1036.HTML](http://www.fondef.cl/bases/fondef/PROYECTO/97/F/D97F1036.HTML)

### 3.1.3.3 iniciadores fluorescentes

La secuenciación del ADN a gran escala se realiza frecuentemente con sistemas automáticos, que utilizan iniciadores o cebadores fluorescentes en reacciones de secuenciación con didesoxinucleótidos.

Las hebras de ADN sintetizadas se someten a electroforesis y se van pasando a través de un haz de laser que excita el marcador fluorescente. La luz emitida es detectada por un fotomultiplicador, y un ordenador recoge y analiza los datos. Este tipo de secuenciación automática de ADN ha permitido el análisis a gran escala necesario para determinar las secuencias completas del genoma de bacterias, levaduras, *C. elegans* y *Drosophila*.<sup>71</sup>

### 3.1.3.4 Sistema de capilaridad electroforética

Aunque los secuenciadores en gel todavía son utilizados por numerosos laboratorios, los equipos de secuenciación más modernos utilizan sistemas de electroforesis capilar, ya que presenta muchas ventajas comparado con la electroforesis tradicional en gel. Los capilares garantizan una disipación mucho más eficiente del calor, lo que permite la aplicación de voltajes de electroforesis mucho más elevados, y por tanto, tiempos de carrera más cortos. Además mediante el uso de esta tecnología las muestras pre-secuenciadas son inyectadas electrocinéticamente en los capilares en menos de 30 segundos, y dado que el sistema de detección también es más sensible, se requiere menos muestra que con los antiguos geles.<sup>72</sup>

## 3.2 Procedimientos para el procesamiento

Para la secuenciación automatizada se utiliza ADN, el cual puede estar clonado en un vector o haber sido directamente amplificado por PCR.

El éxito en los resultados de secuenciación, está directamente relacionado con la calidad del templado (ADN) y para ello, es de suma importancia atender los

---

<sup>71</sup> Cooper, G. La Célula. 2004. Ed. Marbán. 2ª Ed. España. Pp 111.

<sup>72</sup> Soberón G. *Pseudomonas Aeruginosa*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

siguientes **requerimientos para el procesamiento y preparación de las muestras:**

### **3.2.1 Extracción y Purificación de ADN**

La extracción de ADN se realizará mediante columnas Miniprep (“kits”). La purificación de productos de PCR se realizará mediante columnas (“kits”) y se recomienda utilizar preferentemente las siguientes marcas de Miniprep o columnas QIAGEN y/o ROCHE (Boehringer), ya que son las que dan mejores resultados. El usar otras marcas reduce las posibilidades de tener éxito o reproducibilidad en los resultados.<sup>73</sup>

Eluir el ADN de la columna en 50 µl de H<sub>2</sub>O HPLC o MiliQ estéril (no utilizar el “buffer” de elusión que contienen los “kits” ni el buffer TE).

### **3.2.2 Cuantificación de DNA**

El ADN debe estar visualizado en un gel de agarosa al 1%, después de haber sido purificado (colocar 3µl en cada pozo y teñir con bromuro de etidio) y tomar fotografía del gel.

Para determinar la concentración, ésta debe cuantificarse por espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm (ambas condiciones son importantes ya que el ADN puede tener contaminación de otro ADN o ARN que afectan la absorbancia a 260nm por lo que la concentración de ADN será sobreestimada). Además es necesario cuantificar contaminantes de proteínas a 280nm y carbohidratos a 230nm y realizar las siguientes correlaciones:

Determinar las relaciones:  $260/280 = \text{rangos } \sim 1.8-2.0$   $230/260 = \text{rango } 0.3-0.6$

Una vez obtenida la absorbancia del ADN, determinar la concentración en base a la regla que  $1 \text{ OD a } 260\text{nm} = 50\text{ng}/\mu\text{l}$ <sup>74</sup>.

---

<sup>73</sup> <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ingenieria/2001832/lecciones/secuen-ciamiento.html>

<sup>74</sup> Holloway, B. W. & A. F. Morgan. 1986. Genome organization in *Pseudomonas*. Annu. Rev. Microbiol. 40: 79-105.

### 3.2.3 Concentración del ADN para su secuenciación

Todas las muestras deben estar en agua grado HPLC o MiliQ.

Colocar en un tubo de 200  $\mu$ l (de PCR) el ADN en un volumen final de 15  $\mu$ l, a una concentración dependiendo de la molécula:

PCR (1000 pb): 100 ng, es decir, 10 ng de ADN templado por cada 100 bp de producto de PCR.

Lambda: 1.5  $\mu$ g total.

Cadena sencilla: 20 ng/ $\mu$ l (100 ng).

Cósmido: 1  $\mu$ g.

Preparar una alícuota de cada oligonucleótido a utilizar a 5 pmol/ $\mu$ l.

Adicionar 1  $\mu$ l (5 pmol/ $\mu$ l) del oligonucleótido a utilizar a cada tubo.

### 3.2.4 Oligonucleótidos

**T7** 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'  
**SP6** 5' - ATT TAG GTG ACA CTA TAG - 3'

Las muestras no deben estar:

Diluidas en "buffer" TE o "buffer" de elusión de los "kits"

Con Sales (230/260 elevado)

A 260/280 fuera de rango

Con el ARN superior a 1 $\mu$ g.

En vectores de clonación de crecimiento lento como JM101.

Con etanol o fenol.

Es necesario mantener las muestras en tubos de 200  $\mu$ l para PCR.

Se deberán seguir las siguientes instrucciones:

Purificar las muestras como se indica en la parte superior.

Colocar las muestras en tubos eppendorff de 1.5 ml.

Precipitar las muestras agregando 0.56 volúmenes de isopropanol (a temperatura ambiente), centrifugar 30 min a 12,000 rpm a 4 °C. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla agregando 500 µl de etanol al 70 % (frío), centrifugar 15 min a 4° C.<sup>75</sup>

Decantar el sobrenadante y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente de 15 a 30 min. (hasta que ya no se observe líquido en el fondo del tubo).

Primero se prepara el ADN monocatenario que servirá de plantilla (que es una de las hebras del ADN bicatenario de interés; como suele ser muy difícil separar las hebras de ADN, el método se utiliza usualmente para secuenciar ADN monocatenarios clonados, por ejemplo, en vectores plasmídicos). El ADN monocatenario que servirá de plantilla se mezcla con un cebador adecuado (p. ej.: un segmento de restricción o un oligodesoxinucleótido sintético) para formar el híbrido plantilla-cebador.

La mezcla se divide luego en cuatro muestras. Una, la muestra T, se incuba con una ADN-polimerasa (p. ej.: el fragmento Klenov de la ADN-polimerasa I de *E. coli*) en presencia de una mezcla de ddTTP (2',3'-didesoxitimidina trifosfato) en baja concentración y de dTTP (desoxitimidina trifosfato) y los tres desoxinucleósidos trifosfato restantes (dATP, dGTP y dCTP, uno de los cuales ha sido marcado con <sup>32</sup>P o con <sup>35</sup>S) en concentraciones normales. Como la nueva hebra se sintetiza a partir del OH 3' del cebador, la posición de la timina (T) será ocupada, en la mayoría de los casos, por el ácido timidílico (dT) y la hebra seguirá elongándose conforme se vayan añadiendo los otros tres nucleósidos fosfato, pero ocasionalmente será ocupada por la 2',3'-didesoxitimidina fosfato (ddT) en el lugar del ácido timidílico y no seguirá elongándose, dado que los didesoxianálogos de los nucleósidos trifosfato (ddNTP) carecen del grupo hidroxilo en la posición 3' que permitiría continuar la elongación.

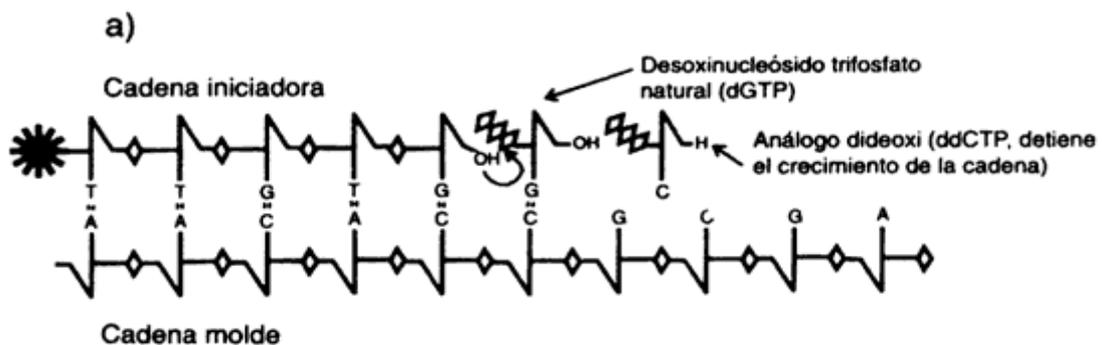
---

<sup>75</sup> Robert, F. The Race for the \$1000 Genome. Science, 17 mar 2006. vol 311.

Por consiguiente, al final de la reacción, en el tubo que contiene la muestra T, se obtiene una mezcla de segmentos de ADN cuyos extremos 3' acaban en ddT (corresponde a la posición de la timina) y cuyos extremos 5' son idénticos (puesto que es el extremo 5' del cebador). Si la misma reacción se realiza con cada uno de los didesoxianálogos restantes (ddCTP, ddGTP y ddATP), se consiguen en sendos tubos mezclas de segmentos de ADN de longitud variable que terminan en las posiciones de la citosina (C), la guanina (G) y la adenina (A), respectivamente.

Luego, los segmentos de ADN obtenidos en las cuatro reacciones independientes se separan en paralelo por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con arreglo a su tamaño, y la pauta de bandas de cada carril indica la ubicación relativa de las bases respectivas en la hebra recientemente sintetizada de ADN. Por consiguiente, la secuencia de la hebra complementaria de la hebra plantilla puede leerse directamente a partir de la autorradiografía del gel<sup>76</sup>.

La secuenciación de ADN es el proceso por medio del cual se determina el orden exacto de las cuatro bases A, T, C y G del genoma de un organismo o de cualquier fragmento de ADN.



<sup>76</sup> John Wyeth Laboratorios S.A. Tazonam: monografía del producto. 1998: 13-19.

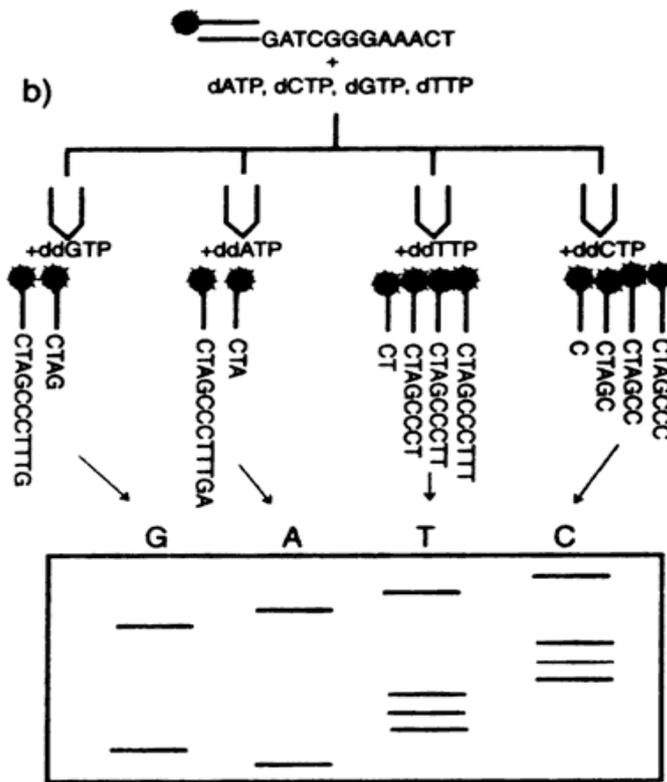


Fig. 9. a y b Diagrama representativo del proceso de secuenciación. En a: se representa el crecimiento de un nuevo fragmento a partir de un cebador (cadena iniciadora) hasta el momento en que se incorpora un nucleótido modificado en su hidroxilo (OH). En b: los fragmentos obtenidos se depositan en los pozos del gel para su corrimiento e identificación.

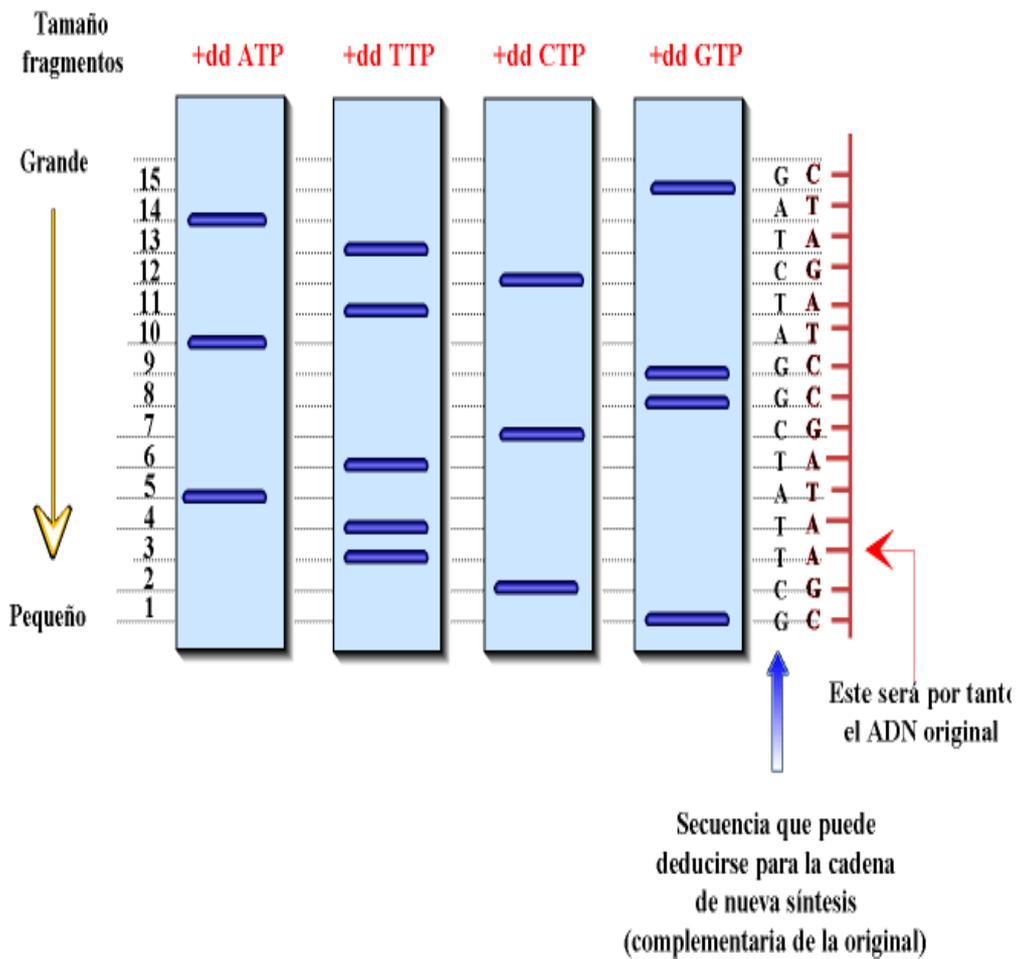


Fig. 10 El corrimiento en el gel se realiza con la aplicación de corriente eléctrica de alrededor de 100 voltios. Después de 8 a 10 horas, con la aplicación de bromuro de etidio se puede evidenciar la presencia de bandas a diferentes niveles que significan el peso de los fragmentos (o largo de las cadenas).

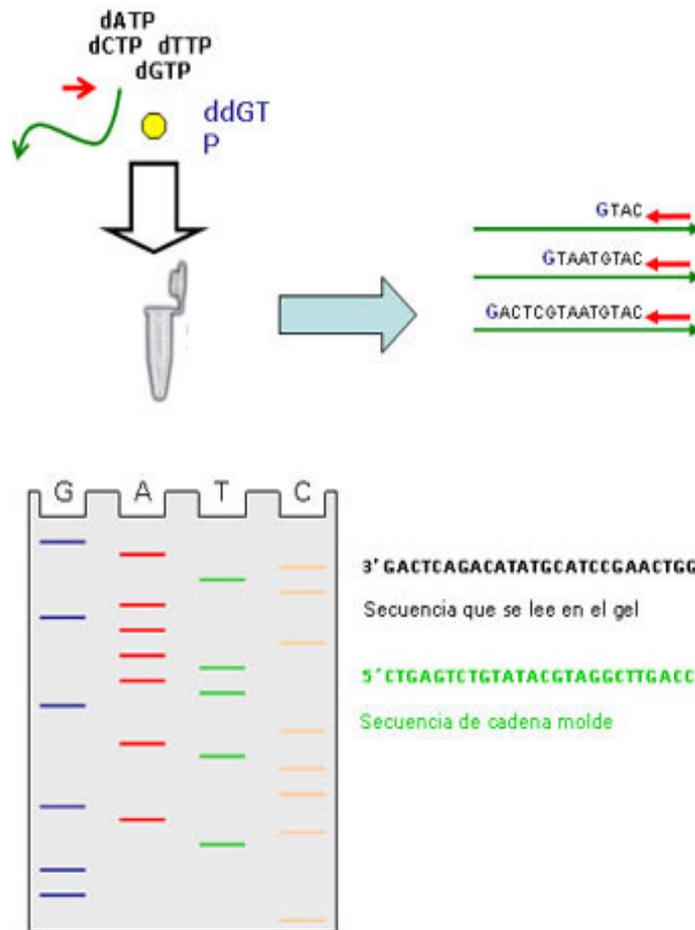


Figura 11. Determinación de la secuencia de nucleótidos: Se colocan en un tubo los cuatro desoxinucleótidos (negro) más un didesoxinucleótido (azul), además del primer, el molde y la ADN polimerasa (círculo amarillo). El resultado de la reacción de síntesis son cadenas de distinta longitud. La incorporación de un nucleótido didesoxi hará que termine el proceso de síntesis.

Esto se debe a que la polimerasa necesita un grupo hidroxilo en la posición 3' para poder agregar el siguiente nucleótido (si este grupo no está presente, la polimerasa no puede continuar con la síntesis). Una vez sintetizado el ADN, se realiza una corrida en gel sembrando los productos de las reacciones correspondientes al agregado de cada uno de los nucleótidos didesoxi. De esta manera, se pueden ver distintas bandas correspondientes a tamaños diferentes. Si leemos las calles de abajo arriba (es decir, de menor a mayor tamaño), tendremos la secuencia del ADN elegido (en orientación 5' → 3').

## Capítulo 4

### Actualizaciones Sobre las Pseudomonas

#### 4.1 Virulencia y Patogenicidad

La patogenicidad de las pseudomonas involucra a muchos factores de virulencia, así como también a los mecanismos de resistencia intrínseca hacia los antibióticos. La mayoría de los determinantes de la virulencia son secretados al ambiente que las rodea por la vía de los mecanismos de secreción tipos I y II; pero *P. aeruginosa* puede también liberar toxinas dentro de las células que infecta, por la vía del sistema tipo III (TTSS), el cual está integrado por alrededor de 20 proteínas.

En cuanto se establece el contacto de la bacteria con la célula hospedera, algunas de esas proteínas son ensambladas en un complejo que atraviesa las membranas de ambas células, permitiendo la translocación de toxinas efectoras directamente al citoplasma de dichas células, donde actúan bloqueando los sistemas de defensa y señalización celulares. La expresión del efector TTSS acompañado de componentes del aparato secretor está bajo el control de un activador transcripcional ExsA, el cual responde a concentraciones bajas de calcio y señales de contacto celular. Entre las proteínas más importantes de TTSS se encuentra ExoU, la cual interfiere con la integridad de la membrana celular.<sup>77</sup>

Otro determinante importante de la virulencia bacteriana es la lectina de unión alfa-galactosa (Galalfa-R) PA-I lectin/adhesin, la cual facilita la adherencia a la superficie epitelial y causa defectos en la barrera celular, permitiendo la penetración de toxinas. Además, PA-IL puede cooperar en la adhesión a la fibronectina. Las lectinas bacterianas pueden facilitar la adhesión bacteriana a las membranas celulares. Los receptores PA-IL presentan alta afinidad a las

---

<sup>77</sup> Robert f. 17 march 2006. vol 311. Science. www.sciencemag.org 1546.

células endoteliales en el riñón, corazón y glándulas adrenales, mientras que no se observa unión a las estructuras vasculares en el páncreas.<sup>78</sup>

La formación de biofilm es un fenotipo importante asociado con infecciones crónicas de *P. aeruginosa*, bacterias en las cuales se ha encontrado una alta habilidad para formar un biofilm, sobre todo en los grupos D a E de la cepa PAO1 de las pseudomonas. Los estudios realizados sugieren una significativa interrelación entre la habilidad para la formación del biofilm y el grupo genético. Estas bacterias tienen requerimientos nutricionales mínimos, toleran una amplia variedad de condiciones físicas y forman biofilm en las superficies bióticas y abióticas.

Los biofilms bacterianos son formados a partir de células libres del medio ambiente y se definen como un complejo exopolisacárido que rodea a la bacteria en diferentes tipos de superficies. Las células bacterianas en los biofilms a menudo muestran una variedad de diferencias fenotípicas, lo cual incluye cambios como la motilidad, producción de polisacáridos extracelulares e incremento de la resistencia a los antibióticos. La capacidad de las pseudomonas de formar biofilms rápidamente, constituye la más importante razón por la cual las infecciones por estas bacterias no responden adecuadamente a los tratamientos que se implementan.<sup>79</sup>

Otro de los mecanismos que se han estudiado en este tipo de bacterias lo constituye el sistema de los operones (ver terminología) MexPQ-OpmE, así como MexMN-OprM, los cuales funcionan como bombas de eflujo multidroga cuando se expresan en las pseudomonas, permitiéndole a estos microorganismos escapar a la toxicidad de los agentes antimicrobiales, eliminando a muchos de los compuestos con los que entran en contacto.

---

<sup>78</sup> Kirkeby S, Hansen A, d'Apice A, Moe D. The Galactophilic Lectin (PA-IL, gene LecA) from *Pseudomonas aeruginosa*. Its Binding Requirements and the Localization of Lectin Receptors in Various Mouse Tissues. *Microbial Pathogenesis* 40 (2006) 191–197

<sup>79</sup> Yetkin G, Otlu B, Cicek A, Kuzucu C, Durmaz R. Clinical, microbiologic, and Epidemiologic Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in a University. *Am J Infect Control* 2006;34:188-92.

Las bacterias pueden adquirir genes para las bombas de expulsión o puede ser que un gen silencioso se active y se convierta en productor de una de esas bombas, lo cual la vuelve resistente a esos compuestos. La secuenciación genética de *P. aeruginosa* evidenció la existencia de 34 genes u operones para bombas de expulsión de drogas.<sup>80</sup>

En otros estudios se encontró que el sistema de expulsión MexAB-OprM exporta determinantes de invasión que contribuyen a la virulencia de la bacteria; así como también el sistema de regulación llamado: sistema sensor de quórum, el cual regula la síntesis de varios factores de virulencia en estas bacterias.<sup>81</sup>

En las pseudomonas, varios transportadores de división de nodulación de la resistencia (RND) que constituyen una familia de las bombas de expulsión, tales como TtgB, Ge, TrgH, SrpB y Arpa de *P. putida* y mexB, MexD y mexF de *P. aeruginosa* han sido determinados como exportadores de solventes orgánicos.<sup>82</sup>

Los integrones son otro tipo de reguladores que pertenecen a una clase de estructuras genéticas que contienen uno o más genes tipo casset insertados en un sitio específico. Se definen por la presencia de un gen tipo integrasa, un sitio de recombinación y uno o dos promotores responsables de la expresión de los genes casset insertados. Los integrones clase 1 son los más estudiados y están implicados en la diseminación de la resistencia a los antibióticos de aislados clínicos. El análisis de los integrones puede ser una herramienta útil

---

<sup>80</sup> Mima T, Sekiya H, Mizushima T. Gene Cloning and Properties of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 49(11), 999-1002, 2005.

<sup>81</sup> Kondo A, Hirakata Y, Gotoh N, Fukushima K. Quorum Sensing System Lactones Do Not Increase Invasiveness of a mex AB-OprM Efflux Mutant but Do Play a Partial Role in *Pseudomonas aeruginosa* Invasion. *Microbiol. Immunol.*, 50(5), 393-401, 2006.

<sup>82</sup> Li X, Eda S, Nakae T. Organic Solvent-Selective Domain of the Resistance-Nodulation-Division-Type Xenobiotic-Antibiotic Transporters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.*, 50(1), 53-56, 2006

para monitorear las infecciones cruzadas o para identificar fuentes comunes de contaminación en ambientes clínicos.<sup>83</sup>

Es sabido que las pseudomonas como otras bacterias, necesitan nutrientes para su adaptación a diferentes ambientes, para lo cual requieren de diferentes factores; uno de los cuales permite la adaptación rápida al estrés: la guanosina tetrafosfato (ppGpp), cuyo metabolismo está mediado por dos proteínas reguladoras: RelA y la SpoT.

Los efectos de ppGpp no se limitan a la obtención estable de nutrientes sino que también modula la respuesta a la inanición, mediante la síntesis lenta de proteínas, la replicación del ADN y la estimulación del sistema sensor de quórum; contribuyendo de esa manera al desarrollo de la tolerancia a las quinolonas. El gen ppGpp presente en los plásmidos de *P. aeruginosa* está relacionado con la tolerancia al tratamiento con quinolonas, lo cual es resultado de los efectos que ppGpp ejerce en los niveles postranscripcionales o postraslacionales específicos.

Todos estos mecanismos estudiados, hacen que las pseudomonas sean consideradas, entre diferentes tipos de bacterias, las mayores oportunistas patógenas y por consiguiente, las principales causantes de infecciones nosocomiales.

## 4.2 Diagnóstico

La tipificación molecular de las pseudomonas proporciona información útil acerca del origen y transmisión de las diferentes cepas. Recientemente se ha empleado la subtipificación epidemiológica molecular por electroforesis en gel de campo pulsado, en la determinación de las relaciones que existen entre las diferentes cepas y de esa manera poder conocer la fuente de las infecciones, con el propósito de implementar medidas sanitarias, estableciendo controles sobre los brotes localizados en áreas específicas intrahospitalarias.

---

<sup>83</sup> Severino P and Magalhaes V. D. Integrons as Tools for Epidemiological Studies. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 156-162.

### 4.3 Tratamiento

Siendo las fluoroquinolonas los principales agentes antimicrobianos en el tratamiento contra las pseudomonas, la habilidad de éstas para convertirse en resistentes a esas drogas permanece como un problema clínico importante. Se han propuesto dos mecanismos para esa resistencia: uno es la alteración de la ADN girasa (un heterotetrámero en forma de A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) y la topoisomerasa IV ( un heterotetrámero en forma de C<sub>2</sub>E<sub>2</sub>), causado por mutaciones en la región determinante de la resistencia a las quinolonas.

Las otras formas de resistencia lo constituyen la sobre expresión de proteínas que construyen diferentes sistemas de expulsión de drogas y la alteración de múltiples reacciones enzimáticas; habiendo sido verificado que ambas actividades ocurren simultáneamente durante el tratamiento y que la alta resistencia a las fluoroquinolonas puede surgir inesperadamente.<sup>84</sup>

La monoterapia con aminoglucósidos es inadecuada para *P. aeruginosa* durante el desarrollo de una bacteriemia, sin embargo la optimización de la dosis por principios farmacodinámicos, ha mejorado los resultados en el control de la infección.<sup>85</sup>

Dadas las dificultades encontradas en nuestro armamento antimicrobiológico actual debido a la resistencia de este tipo de bacterias, y la falta de nuevas drogas, se ha reportado que los aminoglucósidos pueden jugar un papel importante en el tratamiento; para lo cual se aconseja sobre todo en los casos delicados, el uso de dos drogas de diferente clase y así garantizar que el paciente reciba el tratamiento apropiado.<sup>86</sup>

---

<sup>84</sup> Viducic D, Ono T, Murakami k, susilowati k. Functional Analysis of SpoT, rel A and dksA Genes on Quinolone Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under Nongrowing Condition. *Microbiol. Immunol.*, 50(4), 349-357, 2006

<sup>85</sup> Lyytikäinen O, Golovanova V, kolho E, Ruutu P. Outbreak Caused by Tobramycin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Bone Marrow Transplantation Unit. *Scand J Infect Dis* 33: 445-449, 2001

<sup>86</sup> Furno P, Bucaneve G, Del Favero A. Combination Antibiotic Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* Bacteraemia. *Lancet Infect Dis* 2002. 2: 231-42.

La Amikacina es la más efectiva, mientras que la Ceftriaxona es la menos efectiva entre los antibióticos conocidos. En las antibióticoterapias, algunos de los principales problemas que han sido detectados, lo constituyen las transmisiones cruzadas de diferentes cepas, así como los tratamientos mal realizados o sea la deficiencia en los regímenes de tratamiento, lo cual deberá tomarse en cuenta también para la prevención de las resistencias bacterianas.<sup>87</sup>

Los pacientes que han sido tratados con esquemas apropiados, de acuerdo con el tipo de antibiótico (Ej: Amikacina más una cefalosporina o bien una quinolona), en las concentraciones recomendadas, en las dosis diarias apropiadas y durante el tiempo correspondiente, han respondido adecuadamente y se han curado de manera satisfactoria. El problema lo constituyen los pacientes con algunas deficiencias como inmunodepresión, cáncer, desnutrición, diabetes u otro padecimiento crónico o degenerativo, para los cuales son muy frecuentes las recaídas o el inicio de una nueva infección.

#### **4.4 Prevención**

Desde hace varios años y en muchos países, incluyendo a Guatemala, fueron creados programas epidemiológicos para controlar las infecciones nosocomiales resistentes a los antibióticos, a pesar de lo cual las infecciones se han incrementado, cuestionando la factibilidad de esos controles. Se han creado recientemente programas que involucran fundamentalmente medidas de prevención, higiene y educación para el personal médico y paramédico, con lo cual se han logrado disminuir los costos de los programas anteriores que

---

<sup>87</sup> Niga T, Ito H, Oyanmada Y. Cooperation Between Alteration of DNA Gyrase Genes and Over-Expression of MexB and MexX Confers High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from a Patient Who Received a Liver Transplant Followed by Treatment with Fluoroquinolones. *Microbiol. Immunol.*, 49(5), 443-446, 2005.

consistían fundamentalmente en el empleo de diferentes tipos de antibióticos.<sup>88, 89</sup>

Algunos de estos programas han recibido los nombres de NNISS (Sistema de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales Nacionales de EU), VICONOS (Red de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de España), RECCAVIR (Red Centroamericana y del Caribe de Vigilancia de la Resistencia), Comité de Vigilancia para las Infecciones Nosocomiales del Hospital Roosevelt (en Guatemala), etc., cuyas actividades consisten fundamentalmente en la determinación y monitoreo de las infecciones endémicas, comparación de datos sobre la incidencia de infecciones entre diferentes hospitales y de acuerdo con criterios estandarizados, monitorear a pacientes que ingresan a cirugía, así como a pacientes con indicadores de riesgo. Estos programas han revelado que 36.88% de las infecciones detectadas en siete años no corresponden a datos exclusivamente microbiológicos, sino que son consecuencia del tratamiento empírico que han recibido.<sup>90</sup>

---

<sup>88</sup> Kirkeby S, Hansen A, d'Apice A, Moe D. The galactophilic Lectin (PA-IL, Gene LecA) from *Pseudomonas aeruginosa*. Its Binding Requirements and the Localization of Lectin Receptors in Various Mouse Tissues *Microbial Pathogenesis*. *Microbial Pathogenesis* 40 (2006) 191–197.

<sup>89</sup> Farr B, Salgado C, Karchmer T and Sherertz R. Can Antibiotic-Resistant Nosocomial Infections be Controlled?. *Lancet Infectious Diseases* 2001; 1: 38–45.

<sup>90</sup> Pauw BE, Deresinski SC, Feld R, Lane-Allman EF, Donnelly JP. Ceftazidime Compared with Piperacillin and Tobramycin for the Empiric Treatment of Fever in Neutropenic Patients with Cancer. *Microbiol Immunol.*, 50(4), 349-357, 2006-06-26.

## Conclusión

La importancia de las pseudomonas radica fundamentalmente en la diversidad de procesos infecciosos en que se encuentran, así como en la variabilidad de su respuesta a la actividad inmunológica de los organismos. Existen diferentes especies de pseudomonas, siendo *P. aeruginosa* el patógeno más importante entre las bacterias que desarrollan infecciones intrahospitalarias en las unidades de terapia intensiva, sobre todo por el hecho de presentar dificultades en el tratamiento con antibióticos.

Entre las patologías más importantes producidas por estas bacterias se mencionan: endocarditis de válvula nativa y protésicas, neumonía intrahospitalaria, meningitis, septicemia en neutropénicos y quemados. Después de 10 días de hospitalización, los pacientes empiezan a presentar algún síntoma relacionado con infección por esta bacteria, lo que puede significar un alto riesgo para sus vidas.

En la actualidad existen dos métodos para la secuenciación genética bacteriana, uno químico y uno enzimático. Con el método químico ha sido posible obtener resultados satisfactorios, sin embargo, ha sido evidente que el método enzimático proporciona más información por cada experimento realizado.

Entre las aplicaciones más importantes que se reconocen en la secuenciación del DNA procariota y eucariota consisten en la realización de investigaciones en las áreas relacionadas con medicina, veterinaria y agricultura, así como el estudio de las bases moleculares de múltiples fenómenos biológicos, como la resistencia bacteriana o el estudio de enfermedades hereditarias humanas, por lo cual se considera de importancia la realización de más estudios sobre la capacidad de generar resistencias antimicrobianas por parte de este tipo de bacterias.

El procedimiento más moderno de secuenciación genética es el sistema de capilaridad electroforética, en el cual los capilares garantizan una disipación mucho más eficiente del calor, lo que permite la aplicación de voltajes de

electroforesis mucho más elevados, y por tanto, tiempos de carrera más cortos. Las muestras pre-secuenciadas son inyectadas electrocinéticamente en los capilares en menos de 30 segundos, requiriéndose además, menos muestra que con los antiguos geles durante el corrimiento.

Se considera de importancia el desarrollo de un trabajo informativo y de educación al personal médico y paramédico sobre la participación de las pseudomonas en la generación de infecciones bacterianas de diferentes sistemas. Para lo cual debe de realizarse un exhaustivo control de flora microbiana intrahospitalaria cronológicamente, priorizando el uso racional de los antibióticos acompañados de un estudio de sensibilidad previa, y ante la sospecha de una infección por esta bacteria se aconseja antibioticoterapia empírica combinada hasta obtener los resultados del cultivo, como un esfuerzo por disminuir la emergencia que provoca la resistencia microbiana.

Deberá insistirse en la utilización de barreras (guantes, mascarillas, etc.) cuando se manipula a pacientes infectados con esta bacteria, para evitar la diseminación, al mismo tiempo que se requiere de un tratamiento inmediato y efectivo de los infectados, para evitar que se conviertan en focos de infección.

La transmisión de las pseudomonas a través de las manos del personal de salud se ha postulado como un mecanismo frecuente de transmisión en un brote, pero pocas han sido las ocasiones en las que esto se ha documentado durante el mismo, y tal y como lo mencionan Widmer y colaboradores, sólo un estudio de cohorte prospectivo, con cultivos repetidos a lo largo del tiempo en pacientes y personal de salud, podría demostrar la adquisición y la transmisión de este tipo de bacterias por medio de las manos del personal hospitalario, hecho que muy probablemente ocurre en las salas de curaciones.

En los hospitales de Guatemala, a pesar de que ha sido muy pobremente documentado, estas bacterias son causa de complicaciones serias en los tratamientos y en la evolución de los pacientes hospitalizados. De acuerdo con los estudios reportados en este trabajo, ha sido encontrado desde un 17 hasta un 92% de 22 diferentes tipos bacterianos estudiados, tanto en pacientes que

desarrollaron diferente tipo de patología, como en utensilios y paredes hospitalarias.

## Bibliografía

1. Bouza E, García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Díaz MS. *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999, 43: 981-2.
2. Cazali I y Cols. Resistencia de Gérmenes Gram-Negativos en un hospital de Referencia de Guatemala. *Revista de Reccavir*. Vol 1 No. 1. 2001. P 16.
3. Cervantes, C & S. Silver. 1996. Metal resistances in *Pseudomonads*: Genes and mechanisms. In: *Molecular biology of Pseudomonads*. T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas and S. Silver (eds.) ASM Washington DC. 398-416.
4. Cooper GM. *La Célula*. 2ª Ed. 2004. Editorial Marbán. España.
5. Costerton, J. W. 1980 *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, p. 15-24. In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.
6. De Kievit, T., Y. Kakai, K. Register, E. C. Pesci & B. H. Iglewski 2002. Role of the *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in *rhlI* regulation. *FEMS Microbiol. Lett.* 212: 101-106.
7. Frantz, B. & A. M. Chakrabarty. 1986. Degradative plasmids in *Pseudomonas*, p 295-325. In: I. C. Gunsalus, J. R. Sokatch (ed.), *The Bacteria*, vol. X. Academic Press, Inc. Orlando, Fla.
8. Fuqua W. C. M. R. Parsek and E. P. Greenberg. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35: 439-468.
9. Furno P, Bucaneve G, Del Favero A. Combination Antibiotic Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* Bacteraemia. *Lancet Infect Dis* 2002. 2: 231-42.  
Farr B, Salgado C, Karchmer T and Sherertz R. Can Antibiotic-Resistant Nosocomial Infections be Controlled?. *Lancet Infectious Diseases* 2001; 1: 38-45.
10. Govan, J. R. W. & V. Deretic 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60: 539-574.
11. Gracioso C y Cols. Costo de la Infección Intrahospitalaria en Áreas de Cuidado Materno-Infantil en el hospital General San Juan de Dios de la Ciudad de Guatemala. *Revista de Reccavir*. Vol 1 No. 2. 2002. P 54.
12. Harris AD, Perencevich E, Roghmann MC, Morris G, Kaye K, Johnson J. Risk factors for Piperacilin-Tazobactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002, 46: 854-8.

13. Hisham Z, Finch RG. Resistencia antibiótica en el año 2000. Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica 2001, 19: 91-3.
14. Holloway, B. W. 1978. Plasmids that mobilise bacterial chromosomes. Plasmid. 2: 1-19.
15. Holloway, B. W. & A. F. Morgan. 1986. Genome organization in *Pseudomonas*. Annu. Rev. Microbiol. 40: 79-105.
16. <http://www.unileon.es/investigacion/ltiir/saan.htm>.
17. <http://www.medtrad.org/biblioteca/referencia/glosario/E.html><http://www.unileon.es/investigacion/ltiir/saan.htm>
18. <http://www.medtrad.org/biblioteca/referencia/glosario/E.html>
19. <http://www.medtrad.org/biblioteca/referencia/glosario/E.html>
20. <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ingenieria/2001832/lecciones/secuenciamiento.html>
21. Jawetz. Microbiología Médica. 17ª Ed. 2002. Ed. Manual Moderno. México.
22. John Wyeth Laboratorios S.A. Tazonam: monografía del producto. 1998: 13-19.
23. Kirkeby S, Hansen A, d'Apice A, Moe D. The Galactophilic Lectin (PA-IL, gene LecA) from *Pseudomonas aeruginosa*. Its Binding Requirements and the Localization of Lectin Receptors in Various Mouse Tissues. Microbial Pathogenesis 40 (2006) 191–197.
24. Klepser ME, Marangos MN, Zhu Zhu DP, Nicolau DP, Quintiliani R, Nightingale CH. Comparison of the bactericidal activities of Piperacilin-Tazobactam, Ticarcilin-Clavulanate, Ampicilin-Sulbactam against Clinical isolates of *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomona aeruginosa*. Antimicrobial Agents and chemotherapy 1997, 41: 435-9.
25. Kondo A, Hirakata Y, Gotoh N, Fukushima K. Quórum Sensing System lactones Do Not Increase Invasiveness of a mex AB.OprM Efflux Mutant but Do Play a Parial Role in *Pseudomonas aeruginosa* Invasión. Microbiol. Inmunol., 50(5), 393-401, 2006.
26. Ledgham, F., I. Ventre, C. Soscia, M. Foglino, J. N. Sturgis and A. Lazdunski. 2003. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. Mol Microbiol. 48: 199-210.
27. Liang, X., X. Q. Pham, M. V. Olson & S. Lory. 2001. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 183: 843-853.

28. Li X, Eda S, Nakae T. Organic Solvent-Selective Domain of the Resistance-Nodulation-division-Type Xenobiotic-Antibiotic Transporters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.*, 50(1), 53-56, 2006
29. Lodish, H y cols. *Biología Celular y Molecular*. 2002. Ed. Médica Panamericana. 4ª Ed. España.
30. López RA. Sensibilidad de bacterias aisladas en pacientes con neumonía nosocomial a los antibióticos. 1998. Tesis Facultad de Ciencias Médicas, USAC.
31. Lyytikäinen O, Golovanova V, Kolho E, Ruutu P. Outbreak Caused by Tobramycin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Bone Marrow Transplantation Unit. *Scand J Infect Dis* 33: 445-449, 2001
32. Masada, H. M. Kitao, S Eda, E. Yoshihara & T. Nakae. 2002. A novel assembly process of multicomponent xenobiotic efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 46: 677-685.
33. Medina, G., Juárez, K., and Soberón-Chávez G., 2003b, The *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* operon is not expressed on the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer *N*-butanoyl-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 185: 377-380.
34. Mejía C y Cols. Impacto Económico de la Infección Nosocomial en el hospital Roosevelt, Ciudad de Guatemala 2000. *Revista de Reccavir.* Vol 1 No. 2. 2002. P 34.
35. Mima T, Sekiya H, Mizushima T. Gene Cloning and Properties of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 49(11), 999-1002, 2005.
36. Monge V, Diaz-Agero C, Lourdes P, Saa C, Dacosta D. Results of the Spanish National Nosocomial Infection Surveillance Network (VICONOS) for Surgery Patients from January 1997 through December 2003. *Am J Infect Control* 2006;34:134-41.
37. Murray P. *Microbiología Médica*. 4ª Ed. 2002. Ed. Grafos S.A. España.
38. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997, 17: 234-8.
39. Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen., R. J. Dodson, H. Hilbert, 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolic versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799-808.
40. Niga T, Ito H, Oyanmada Y. Cooperation Between Alteration of DNA Gyrase Genes and Over-Expression of MexB and MexX Confers High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from

a Patient Who Received a Liver Transplant Followed by Treatment with Fluoroquinolones. *Microbiol. Immunol.*, 49(5), 443-446, 2005.

41. Ochsner, U. A., K. Koch, A. Fietcher, & J. Reiser 1994 Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 176: 2044-2054.

42. Ortuno A. Determinación del Bacilo G-1 No Fermentador más Frecuente, aislado de Muestras de Pacientes en Encajamiento del Hospital San Juan de Dios y su Sensibilidad Antibiótica. Tesis. 1995.

43. Paramythiotou E, Lucet J-C, Timsit J-F, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Troulliet J-L, Belloc S, Kassis N, Karabinis A, Andreumont A. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 670-7.

44. Pauw BE, Deresinski SC, Feld R, Lane-Allman EF, Donnelly JP. Ceftazidime Compared with Piperacillin and Tobramycin for the Empiric Treatment of Fever in Neutropenic Patients with Cancer. *Microbiol Immunol.*, 50(4), 349-357, 2006-06-26.

45. Pearson, J. P., E. C. Pesci, & B. H. Iglewski 1997 Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis. *J Bacteriol.* 179: 5756-5767.

46. Recinos Z. Microbiología y Epidemiología de Heridas Posoperatorias en Chiquimula. Tesis. 1985.

47. Robert, F. The Race for the \$1000 Genome. *Science*, 17 mar 2006. vol 311.

48. Robert F. 17 MARCH 2006. VOL 311. SCIENCE. [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org) 1546.

49. Rodríguez A. Frecuencia de Microorganismos Causantes de Infección Nosocomial en el Hospital de Ginecoobstetricia del IGSS. Tesis. 1986.

50. Rodríguez C. Infección Nosocomial en un Hospital Privado. Tesis. 1985.

51. Römling, U., K. D. Schmidt, and B. Tummli. 1997. Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J. Mol. Biol.* 271: 386-404.

52. Ruano M. Resistencia de *Pseudomonas* a diferentes antibióticos en el paciente pediátrico. Tesis Facultad de Ciencias Médicas, USAC. 1999.

53. Saliba A, Assis M, Nishi, Raymond B, Marques E, Gazos U, Touqui L, Plotkowski M. Implications of Oxidative Stress in the Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Microbes and Infection* 8 (2006) 450–459.

54. Severino P and Magalhaes V. D. Integrins as Tools for Epidemiological Studies. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 156-162.

55. Soberón G. *Pseudomonas Aeruginosa*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
56. Soloaga R, Tokumoto A, Fernández M, Borga CA, Argüello ZG. Revision de los mecanismos de resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a diversas familias de antibióticos. *Infectología y Microbiología Clínica* 1996, 8: 57-63.
57. Soloaga R, Tokumoto A, Fernández M, Borga CA, Argüello ZG. *Pseudomona aeruginosa* con disociación en la CIM de imipenem y meropenem. *Infectología y Microbiología Clínica* 1996, 8: 64-65.
58. Soloaga R. *Revista Argentina de Microbiología* 2000, 32: 149-52.
59. Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.
60. Tan M.-W. & F. M. Ausubel. 2000. *Caenorabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 29-34.
61. Ventre, I., F. Ledgham, V. Prima, A. Lazdunski, M. Foglino and J. N. Sturgis. 2003. Dimerization of the quorum sensing regulator RhIR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Mol. Microbiol.* 48: 187-198.
62. Viducic D, Ono T, Murakami k, susilowati k. Functional Analysis of SpoT, rel A and dksA Genes on Quinolone Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under Nongrowing Condition. *Microbiol. Immunol.*, 50(4), 349-357, 2006
63. Walter T. *Microbiología*. 2000. McGraw-Hill Interamericana. México.
64. [www.bioq.unizar.es/departamento/docencia/gentica%20molecular.htm](http://www.bioq.unizar.es/departamento/docencia/gentica%20molecular.htm)
65. [www.fondef.cl/bases/fondef/PROYECTO/97/F/D97F1036.HTML](http://www.fondef.cl/bases/fondef/PROYECTO/97/F/D97F1036.HTML)
66. [www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit10-/MolMarkers\\_es/PDF/VOL1/IV.5.pdf](http://www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit10-/MolMarkers_es/PDF/VOL1/IV.5.pdf)
67. [www.ucm.es/.../practicas/secuencia/Secuencia.htm](http://www.ucm.es/.../practicas/secuencia/Secuencia.htm)
68. Yan G, Shi L, Jia L, Yin X. Evaluation of the Biofilm-Forming Ability and Genetic Typing for Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by Enterobacterial Reptitive Intergenic Consensus-Based PCR. *Microbiol. Immunol.*, 49(12), 1057-1061, 2005
69. Yetkin G, Otlu B, Cicek A, Kuzucu C, Durmaz R. Clinical, microbiologic, and Epidemiologic Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in a University. *Am J Infect Control* 2006;34:188-92.
70. Zinser, Joklik, Willet, Amos, Wilfert. *Microbiología*. Buenos Aires: Panamericana 1996: 785-94.

## Siglas Empleadas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
CTX	Citotoxina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ddNTP	Didesoxinucleótidos
Pi	Fosfato inorgánico
PLC	Fosfolipasa C
ppGpp	Guanosina tetrafosfato
kD	Kilodaltones
MFS	Superfamilia de facilitadores principales
NNISS	Sistema de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales Nacionales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TTSS	Sistema tipo III
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
VICONOS	Red de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales

## Terminología empleada en esta tesis

Antibióticos beta-lactámicos	Eliminan a las bacterias inhibiendo la síntesis de la pared.
<i>E. coli</i>	Escherichia coli. Bacteria que coloniza el Tracto intestinal, en donde produce diferentes tipos de diarreas.
Endocarditis	Inflamación del endocardio (músculo cardíaco).
Enzimas	Proteínas con capacidad para metabolizar otras sustancias.
Esporulados	Organismos unicelulares que se reproducen por esporas que liberan al medio ambiente.
Fibrosis quística	Enfermedad pulmonar hereditaria que dificulta El transporte de oxígeno hacia la sangre.
Infecciones nosocomiales	Infecciones adquiridas durante la hospitalización de un paciente y desarrolladas antes o después de su egreso.
Inmunodeprimidos	Pacientes que presentan daños en su sistema inmunológico, ya sea de tipo hereditario, cancerígeno o infeccioso y por lo cual presentan insuficiente respuesta inmune a diferentes procesos infecciosos.
Neumonía	Infección pulmonar.
Neutropénicos	Pacientes con deficiencia de neutrófilos (glóbulos blancos).
Operón	Gen con autorregulación para la síntesis de proteínas en las bacterias.
<i>P. aeruginosa</i>	Pseudomona aeruginosa
Pilli o fimbria	Prolongaciones de proteínas en la superficie de las bacterias.
Plásmidos	Secuencias genéticas cortas circulares que se encuentran en las bacterias fuera de su cromosoma.
Septicemia	Infección en la sangre.
Toxinas	Sustancias capaces de modificar estructuras orgánicas y producir daño celular, liberadas por bacterias.
Cassette (casete)	<b>1.</b> Locus (lugar o región) de secuencias de nucleótidos de función relacionada ubicados en serie o en tándem (tandas), que al sustituirse uno por otro determinan un cambio de fenotipo. <b>2.</b> Secuencia o dominio de aminoácidos. Se habla así de «casetes (dominios) de unión a ATP» ( <i>ATP-binding cassettes</i> ), «hidrólisis de ATP mediante esos casetes (dominios)», «casete (secuencia) de 11 aminoácidos», etc.

**3.** Segmento de ADN que se escinde en bloque del fragmento de ADN que lo contiene y se inserta en un ADN homólogo u heterólogo de forma natural o artificial.



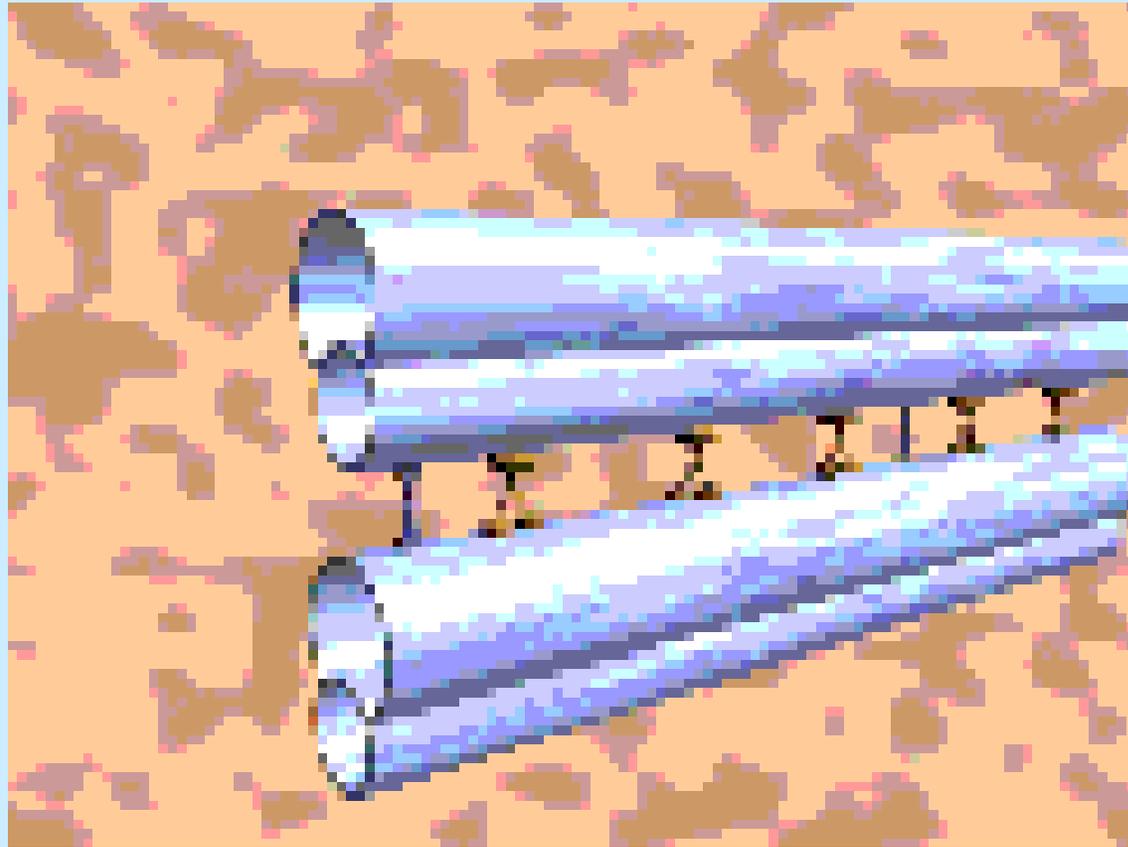
## Anexo 2

Resistencia y susceptibilidad a los antibióticos						
PA#	Nombre de la proteína	Nombre alternativo de la proteína	Nombre del gen	Nombre alternativo del gen	Rango De	Rango A
<a href="#">PA042</a> <a href="#">5</a>	RND Precursor de proteína de fusión a membrana		mexA		47202 4	47317 5
<a href="#">PA042</a> <a href="#">6</a>	RND transportador de salida de multidrogas MexB		mexB		47319 1	47633 1
<a href="#">PA042</a> <a href="#">7</a>	proteína precursora de membrana externa OprM		oprM		47633 3	47779 0
<a href="#">PA070</a> <a href="#">6</a>	cloramfenicol acetyltransferasa	acetiltransferasa xenobiótica	cat		78010 1	77946 3
<a href="#">PA103</a> <a href="#">2</a>	probable penicilina amidasa			pac	11222 17	11196 74
<a href="#">PA112</a> <a href="#">9</a>	probable proteína de resistencia a fosfomicina				12216 91	12220 98
<a href="#">PA113</a> <a href="#">1</a>	Probable transportador MFS				12243 28	12230 60
<a href="#">PA185</a> <a href="#">8</a>	estreptomicina 3"-fosfotransferasa		str		20187 94	20179 67
<a href="#">PA195</a> <a href="#">9</a>	bacitracina proteína de resistencia	undecaprenol kinasa	bacA		21431 73	21440 06

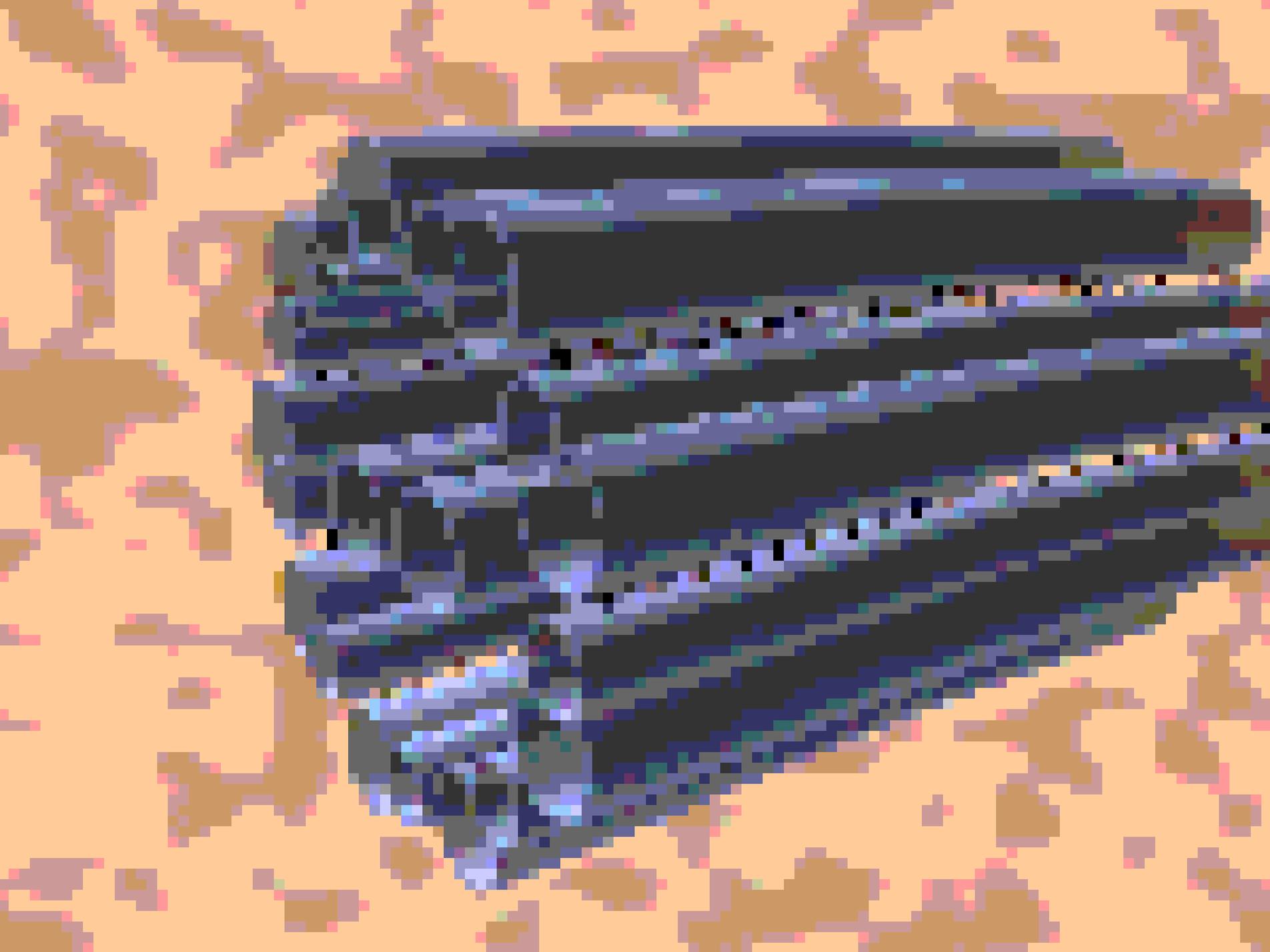
### Anexo 3

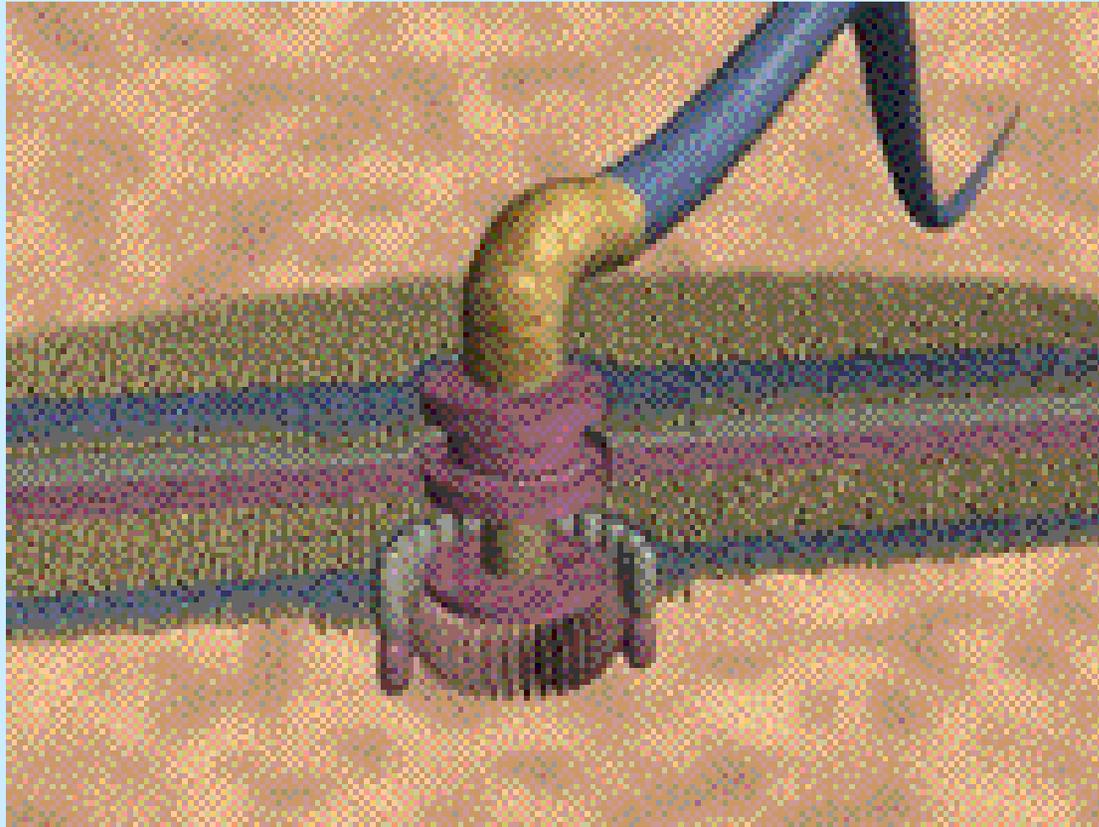
Factores Secretados (toxinas, enzimas, alginato)						
PA#	Nombre de la proteína	Nombre de proteínas	Nombre del gen	Nombre de todos los genes	Rango De	Rango A
<a href="#">PA0041</a>	probable hemaglutinina				42914	53521
<a href="#">PA0044</a>	exoenzima T		exoT		58786	60159
<a href="#">PA0263</a>	proteína secretada Hcp		hcpC		297561	297043
<a href="#">PA0763</a>	factor anti-sigma MucA		mucA		831914	832498
<a href="#">PA0764</a>	regulador negativo para alginato biosíntesis de MucB		mucB	algN	832507	833457
<a href="#">PA0765</a>	regulador positivo para alginato biosíntesis de MucC	AlgM	mucC		833454	833909
<a href="#">PA0766</a>	precursor de serina proteasa MucD		mucD		833949	835373
<a href="#">PA0843</a>	precursor de fosfolipasa proteína accesoria PlcR		plcR		919240	918617
<a href="#">PA0844</a>	precursor de fosfolipasa C hemolítica		plcH	plcS phIC	921450	919258
<a href="#">PA0852</a>	precursor de proteína de unión a quitina CbpD		cpbD		931822	930653
<a href="#">PA1150</a>	picina S2		pys2		1243594	1245663
<a href="#">PA1246</a>	proteína de secreción de proteasa alcalina AprD		aprD		1350747	1352528

# CILIOS Y FLAGELOS



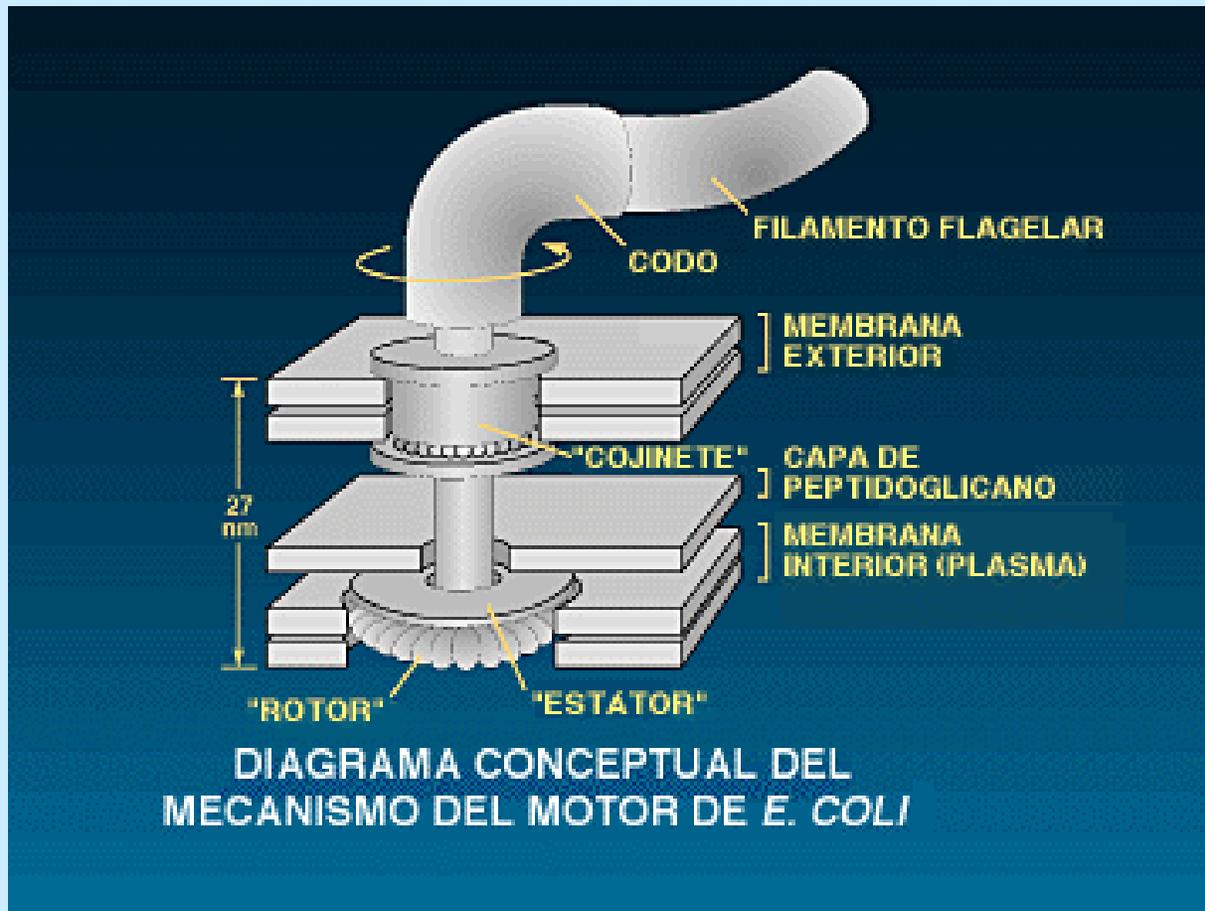
- Estructura interna de cilios y flagelos
- Dobletes
- Movimiento ondulatorio





- Movimiento flagelar
- Desplazamiento celular





- Estructura del flagelo de *E. coli* (sin animación)
- Flagelina

GRACIAS