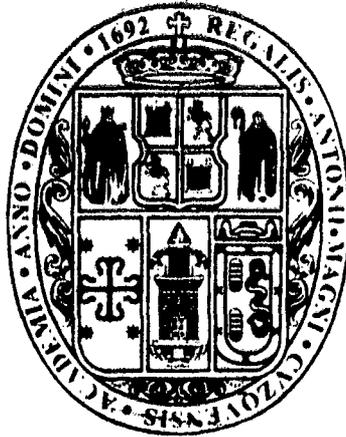


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO  
ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**“BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR  
*Pseudomonas aeruginosa* Y SU ACCION  
INHIBITORIA FRENTE A *Helicobacter pylori*”**

**PRESENTADA POR**

**Br. Ruth Elizabeth Condori Pariguana**

**Br. Raúl Corrales Montoya**

**Para optar al Título Profesional de  
BIÓLOGO**

**ASESORA:**

**Dra. Daniela I. Flores Calderón**

**CO-ASESORES**

**Dra. Apolinaria García Cancino**

**M.Cs. Hedy Y. Espinoza Carrasco**

**CUSCO -2012**

**AUSPICIADO POR EL CONSEJO DE INVESTIGACION - UNSAAC**

## DEDICATORIA

A mi mamá, que con sosiego y mucho cariño sigue alentándome cada día, a ella cada uno de mis pasos se los entrego con todo mi amor.

A mis hermanos, cada uno un ejemplo distinto, pero el mismo fin... demostrarme vivir tratando siempre de ser feliz.

Para Angeluz y Luna, siempre a mi lado cada noche.

Raúl Corrales Montoya

Mi gratitud, principalmente está dirigida a Dios por haberme dado la existencia y permitido llegar al final de la carrera.

Con todo amor a mi mamá, es a ti a quién debo toda la persona que soy, mi fuente de inspiración en mis momentos de angustia, esmero, dedicación, aciertos y reveses, alegrías y tristezas, que caracterizaron el transitar por este camino. Gracias por tú guía y ejemplo durante todos los años de mi vida. Te quiero.

Rtuh Elizabeth Condori Pariguana

## **AGRADECIMIENTOS**

Son numerosas las personas a las que debemos agradecer por ayudarnos en el logro de nuestra carrera, es demasiado poco, **el decir gracias**, pero en el fondo de nuestro ser les estaremos agradecidos y siempre prestos a tenderles una mano cuando así lo requieran. Sin embargo, resaltaremos solo algunas de estas personas sin las que no hubiésemos hecho realidad este sueño tan anhelado como es la culminación de nuestra carrera universitaria:

- A la Dra. Dariela I. Flores Calderón y M.Cs. Hedy Y. Espinoza Carrasco, por ser nuestros asesores y pilares fundamentales en nuestra formación en el área de Microbiología, por brindarnos su apoyo y orientación en momentos difíciles.
- A la Universidad de Concepción – Chile y en especial a la Dra. Apolinaria del Rosario García Cancino por abrirnos las puertas de su laboratorio y darnos la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos.
- Al Dr. Carlos Gonzales y nuestros amigos Felipe, Juan Pablo, Cristian y Claudio por apoyarnos tan desinteresadamente y brindarnos su amistad.
- A nuestro grupo de investigación por estar siempre presentes como parte de esta tesis.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A todos, esperamos contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

**ELIZABETH Y RAÚL**

## CONTENIDO

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCION

JUSTIFICACION

HIPOTESIS

OBJETIVOS

### CAPITULO I

#### MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes	12
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.2.1 Posición taxonómica	15
1.2.2 Morfología	15
1.2.3 Metabolismo	16
1.2.4 Pigmentos y Sideroforos	17
1.2.5 Quorum Sensing (QS)	18
1.2.6 Plásmidos y Bacteriófagos	19
1.3 Bacteriocinas	20
1.3.1. Bacteriocinas en gram-negativos	21
1.3.2. Bacteriocinas en gram-positivos	24
1.4 Piocinas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
1.4.1 Clasificación de piocinas	26
1.4.2 Piocinas: características comunes	34
1.5 <i>Helicobacter pylori</i>	37
1.5.1 Posición taxonómica	37
1.5.2 Morfología	38
1.5.3 Metabolismo	38
1.5.4 Características bioquímicas	39
1.5.5 Modos de transmisión	40
1.5.6 Prevalencia	41
1.5.7 Resistencia	42

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales	43
2.1.1 Material biológico	43
2.1.2 Medios de cultivo y reactivos	44
2.1.3 Discos de sensibilidad	44
2.1.4 Materiales para PCR y visualización	44
2.1.5 Equipos	44
2.1.6 Otros materiales	45
2.2 Métodos	45
2.2.1 Obtención de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de origen suelo	45
2.2.2 Obtención de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de origen agua y clínico	46
2.2.3 Conservación, transporte y reactivación de cepas	47
2.2.4 Caracterización de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
2.2.5 Inhibición del crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	48
2.2.6 Caracterización de los extractos crudos	49
2.2.7 Identificación molecular de genes de piocinas tipo R por PCR múltiple.	50
2.2.8 Cinética de crecimiento y actividad inhibitoria de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 12S	52
2.2.9 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	52
2.2.10 Cinética de muerte de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	52
2.3 Flujoograma de trabajo	54

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Aislamiento e Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a partir de muestras de suelo	55
3.2 Codificación y numeración de cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56

3.3	Caracterización de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
3.3.1	Susceptibilidad Antimicrobiana	56
3.3.2	Producción de pigmentos	57
3.4	Identificación de cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con actividad inhibitoria frente a <i>Helicobacter pylori</i>	58
3.4.1	Relación entre potencial inhibitorio y procedencia de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	61
3.5	Caracterización para identificación de piocinas en extractos crudos con actividad inhibitoria	62
3.5.1	Identificación de tipos de piocinas en pruebas cruzadas entre cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	62
3.5.2	Identificación de tipos de piocinas en pruebas frente a <i>Helicobacter pylori</i> .	64
3.6	Identificación molecular de genes de piocina R en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con actividad inhibitoria frente a <i>Helicobacter pylori</i>	66
3.7	Cinética de crecimiento y actividad inhibitoria de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 12S	67
3.8	Cinética de muerte de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	68
	DISCUSION	71
	CONCLUSIONES	75
	SUGERENCIAS	76
	BIBLIOGRAFIA	77
	ANEXOS	89

## TABLAS

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas en bacterias gram-positivas	25
Tabla 2. Primers para la detección molecular de piocinas R	50
Tabla 3. Clasificación de cepas <i>P. aeruginosa</i>	56
Tabla 4. Porcentajes de Susceptibilidad/Resistencia por hábitat, para cada antibiótico ensayado.	56
Tabla 5. Cepas de <i>P. aeruginosa</i> con efecto inhibitorio frente a <i>H. pylori</i> de los diferentes hábitat	59
Tabla 6. Diámetro de halos de inhibición (mm) de cepas de <i>P. aeruginosa</i> sometidas a luz UV (extracto crudo) frente a tres cepas de <i>H. pylori</i> .	60
Tabla 7. Inhibiciones cruzadas entre cepas de <i>P. aeruginosa</i> , con y sin tratamiento enzimático	63
Tabla 8. Diámetro de halos de inhibición de extractos crudos con tratamiento enzimático frente a <i>H. pylori</i> ATCC 43504	64
Tabla 9. Diámetro de halos de inhibición de extractos crudos con tratamiento a diferentes temperaturas frente a <i>H. pylori</i> ATCC 43504	65

## FIGURAS

Figura 1. Estructura de piocina tipo R	27
Figura 2. Organización genética de piocina R, en <i>P. aeruginosa</i> cepa PAO1	28
Figura 3. Estructura de piocina tipo F	29
Figura 4. Organización genética de piocina tipo F	30
Figura 5. Organización de dominios en la proteína bactericida	31
Figura 6. Secuencia de nucleótidos de la caja P	34
Figura 7. Mecanismo de regulación de la síntesis de piocina	35
Figura 8. Desarrollo de cepas <i>Pseudomonas spp.</i> en agar Cetrimide	55
Figura 9A. Pigmentos en agar P y agar F	57
Figura 9B. Presencia de pigmento piocianina empleando cloroformo	58
Figura 10. Pruebas de inhibición frente a <i>H. pylori</i> ATCC 43504 ATCC 43504	61
Figura 11. Porcentaje de inhibición entre cepas de <i>P. aeruginosa</i> de origen ambiental y clínico	61
Figura 12. Porcentaje de inhibición entre cepas ambientales de <i>P. aeruginosa</i>	62
Figura 13. Caracterización enzimática con el extracto crudo de <i>P. aeruginosa</i> cepa 12S frente a <i>H. pylori</i> ATCC 43504.	64
Figura 14. Caracterización térmica frente a <i>H. pylori</i> ATCC 43504	66
Figura 15. Amplificación por PCR múltiple del gen piocina R en <i>P. aeruginosa</i>	67
Figura 16. Cinética de crecimiento y actividad inhibitoria de <i>P. aeruginosa</i> cepa 12S	68
Figura 17. Cinética de muerte de <i>H. pylori</i> ATCC 43504	69

## RESUMEN

Las bacteriocinas definidas como proteínas con un modo de acción bactericida, fueron descritas por primera vez en *Escherichia coli* y posteriormente en bacterias gram positivas. Estas poseen un espectro de inhibición relativamente reducido, actuando sobre cepas distintas de la misma especie productora, sin embargo algunas son capaces de actuar frente a especies de otros géneros, como lo observado en bacterias lácticas, cuyas bacteriocinas son ampliamente usadas en la conservación de alimentos. Esta característica particular de las bacteriocinas de actuar frente a otros microorganismos fuera de su especie también es compartida por algunas bacterias gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*.

Las piocinas, bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, que presentan gran similitud por su analogía estructural con las colas de los bacteriófagos y bacteriocinas de *E. coli* (colicinas), poseen la capacidad de inhibir a otros microorganismos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus ducreyi*, y *Haemophilus influenzae*.

Este trabajo estudio el posible rol de las piocinas en el crecimiento de *Helicobacter pylori*, empleando extractos crudos de 32 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de 3 hábitat distintos (agua, suelo y clínico). Para lograr el objetivo se realizaron pruebas de caracterización de los extractos crudos y determinación molecular por PCR,

Se identificaron 9 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con efecto inhibitorio de origen ambiental; las pruebas realizadas de termo resistencia a diferentes temperaturas, tratamiento enzimático (tripsina), junto al análisis molecular de genes de piocinas, demuestran que las piocinas no están comprometidas con este efecto. El compuesto inhibitorio presente en el extracto crudo de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 12S posee actividad bactericida frente a *Helicobacter pylori* ATCC 43504 y es de naturaleza no proteica.

## INTRODUCCION

Las bacterias, durante su evolución han adquirido múltiples mecanismos de adaptación que les permiten tener éxito en la competencia por nutrientes y espacio en su hábitat. Estos mecanismos parten desde el mejoramiento en los sistemas de quimiotaxis, hasta la producción de sustancias alelopáticas como sistema de defensa bacteriano, estas sustancias incluyen productos metabólicos como amonio o peróxido de hidrogeno, los antibióticos clásicos como la bacitracina y polimixina B, agentes líticos parecidos a lisozimas y péptidos antimicrobianos o bacteriocinas (Gordon D. y col., 2007).

Las bacteriocinas se definen como proteínas biológicamente activas con acción bactericida, y poseen un espectro bactericida relativamente estrecho frente a bacterias de la misma especie productora (Riley M. y col., 2002). Estas proteínas son sintetizadas por la gran mayoría de los grupos bacterianos, de hecho, se ha propuesto que el 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina, ya que éstas se han encontrado en la mayoría de las especies examinadas que abarcan los grupos de bacterias gram positivas, gram negativas y Arqueas (Klaenhammer T. y col., 1988; Raloff J., 1998).

*Pseudomonas aeruginosa* bacilo gram negativo, es un microorganismo cosmopolita ya que puede habitar en agua, suelo, plantas y animales (Palleroni N., 1992), produce una bacteriocina denominada piocina con acción bactericida frente a cepas sensibles de su misma especie, sin embargo se ha reportado que pueden actuar sobre otras bacterias gram negativas (Phillips N. y col., 1990; Levin J. y col., 1996). El rol que estas desempeñan no es claro y podrían servir como mecanismo para el predominio de una cepa en su nicho ecológico (Michell-Briand Y. y col., 2002).

*Helicobacter pylori*, microorganismo microaerófilo gram negativo que se ha adaptado para sobrevivir en las condiciones acidas del estómago bajo la mucosa gástrica, es considerado agente causal de la gastritis crónica activa, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT (Thomsen L. y col., 1990). Su erradicación es cada vez más difícil debido al progresivo aumento de su resistencia a antibióticos terapéuticamente útiles como Metronidazol, Claritromizina y macrólidos (Chey W. y col., 2007).

La colonización por *H. pylori* en pacientes con anemia perniciosa disminuye a medida que la enfermedad progresa a gastritis atrófica en fase terminal, lo que se asocia con la colonización de la mucosa gástrica con flora comensal entre los cuales se encuentra *Pseudomonas spp.* (Deprez P. y col., 1991), este hallazgo y el conocimiento de que la producción de sustancias extracelulares juegan un papel en la erradicación de *H. pylori* como el observado en *Lactobacillus spp.* (García A. y col., 2009), así como estudios *in-vitro* que muestran un efecto inhibitorio de *P. aeruginosa*, sugiere un posible papel de las pirocinas en esta inhibición (Krausse R. y col., 2005).

Por lo mencionado y con la ejecución del presente estudio se pretende contribuir al conocimiento del rol que juegan las pirocinas de *P. aeruginosa* en el efecto inhibitorio frente a *H. pylori*.

## JUSTIFICACION

Desde el primer aislamiento de *Helicobacter pylori* en 1980, la infección bacteriana evoluciono significativamente. Actualmente, para los gastroenterólogos, la erradicación de *H. pylori* es un gran desafío ya que cada día está aumentando la resistencia primaria de este microorganismo a los antibióticos más frecuentemente utilizados en su tratamiento (Blaser M. y col., 2004), la cual se debe en parte a la exposición de la población a esos antibióticos como monoterapia para diversas enfermedades infecciosas (Graham D. y col., 2008). Este incremento en la resistencia bacteriana influye principalmente sobre la prevalencia de la infección por *H. pylori*.

La prevalencia mundial es mayor a 50%, en el Perú las investigaciones relacionadas reportan valores de 58.7% al 2002 (Ramírez A. y col., 2004) y en la ciudad del Cusco el 68.9 % de la población presenta infección por dicha bacteria (Quispe F. y col., 2009).

En tal sentido es necesario investigar terapias toleradas que superen las resistencias a los antimicrobianos, como el uso de sustancias proteicas con actividad antimicrobiana que son las bacteriocinas que en el género *Lactobacillus* mostro gran actividad inhibitoria frente a *Helicobacter pylori* (García A. y col., 2009), proteínas que también produce *Pseudomonas aeruginosa* un agente infeccioso predominante en los pulmones de pacientes adultos con fibrosis quística y que también es ubicuo estando presente en ambientes naturales.

Por ello esta investigación está orientada en la caracterización de la sustancia inhibitoria producida por *Pseudomonas aeruginosa* de distintos hábitat y su efecto inhibitor frente a cepas patrón de *Helicobacter pylori*.

## FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Será *Helicobacter pylori* inhibido frente a la acción de bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*?

## **HIPOTESIS**

Las bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* inhiben el crecimiento de *Helicobacter pylori*.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad inhibitoria de bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de distintos hábitat frente a *Helicobacter pylori*.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar *Pseudomonas aeruginosa* a partir de muestras de suelos agrícolas.
2. Identificar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen agua, suelo y clínico, con actividad inhibitoria frente a *Helicobacter pylori*.
3. Caracterizar parcialmente el extracto crudo de *Pseudomonas aeruginosa* con actividad inhibitoria sobre *Helicobacter pylori*.
4. Identificar mediante la técnica de PCR múltiple la presencia de bacteriocinas en *Pseudomonas aeruginosa*.

## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

#### 1.1. ANTECEDENTES

- **Kohler T. y col 2010 (Suiza).** Realizan un análisis de la distribución de los genes para la piocina tipo R en una colección de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Mediante ensayos por PCR identificaron cepas productoras de piocina tipo R1 (25%), piocina R2 (17%), y piocina R5 (29%). Las cepas deficientes de piocinas R eran susceptibles a las piocina R1, R2, y R5, mientras que la mayoría de cepas productoras de piocina R2 y R5 fueron resistentes. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto el papel potencial de las piocinas en la formación de las poblaciones bacterianas durante la colonización y el uso de estas moléculas como agentes bactericidas específicos y potentes.
- **Krausser R. y col 2005 (Alemania).** Determinaron el efecto inhibitorio de varios microorganismos en el crecimiento de *Helicobacter pylori*. Emplearon 29 microorganismos diferentes contra 31 cepas de *H. pylori* obtenidas de biopsias gástricas, dicho efecto inhibitorio fue detectado usando dos técnicas modificadas basadas en el método "estrías en cruz" con cultivos de 48h de las bacterias a probar, sobre placas previamente sembradas con *H. pylori* por el método de agotamiento en superficie. Los resultados para *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, mostraron una fuerte inhibición la cual fue dependiente de las cepas ensayadas y del método usado entre otros. *P. aeruginosa* mostró una inhibición del 94% de las cepas ensayadas de *H. pylori*, así como una inhibición en reversa de *H. pylori* contra *P. aeruginosa* no significativa. Llegando a la conclusión de que *H. pylori* es inhibida por un significativo número de bacterias comensales resultado de una interacción antagónica bacteriana.

- **Lacey S. y col 1995 (Londres).** Demostraron *in vitro* la inhibición de cepas de *Helicobacter pylori* (sensibles y resistentes a metronidazol) por acción de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudio empleo diez aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, que fueron ensayados contra diez cepas de *H. pylori* (cinco sensibles a metronidazol y cinco resistentes a metronidazol), haciendo uso del método "Estrías en cruz". Sólo cinco cepas de *P. aeruginosa* mostraron actividad inhibitoria, sin embargo, estos inhibieron todas las cepas de *H. pylori*.
- **Higerd T. y col 1967 (EE.UU).** Caracterizaron *in vitro* e *in vivo* una piocina obtenida por cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* lisados mediante rayos ultravioleta, sus cultivos bacterianos fueron analizados por microscopia electrónica observando partículas en forma de bastón que se asemejaban a las partículas de la proteína contráctil de la cola de los fagos T en *Escherichia coli*. Las partículas mostraron un diámetro aproximado de 20-90 m $\mu$ , núcleo de 5 $\mu$ m y una longitud de la vaina de 50m $\mu$  y no se observaron fagos, Sus estudios *in vivo* indican que la piocina purificada no es letal para ratones cuando se inyecta por vía intraperitoneal en concentraciones de 28000-14000 unidades (5.6 – 276  $\mu$ g de proteína), ni tampoco en conejos en concentraciones de 7200 – 36000 unidades.

## **1.2 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas* es un género de especies capaces de vivir bajo muy diversas condiciones ambientales, por los simples requerimientos nutritivos que posee, los rango de compuestos de carbón (orgánicos e inorgánicos) que utiliza, y la gran adaptabilidad genética y metabólica, pueden vivir en numerosos hábitat que van desde diversos ambientes acuáticos y terrestres, hasta tejidos diversos de animales y plantas (Palleroni J. y col., 1992). La mayoría de las especies de este género son aeróbicas estrictas, el oxígeno es aparentemente casi el único requerimiento obligado y cualquier hábitat con un rango de temperatura de 4 a

42°C, un pH comprendido entre 4 – 8 y que contenga compuestos orgánicos simples o complejos, es un hábitat potencial para *Pseudomonas*. Algunas especies de este género producen pigmentos fluorescentes como *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, denominándose “*Pseudomonas fluorescentes*” (Ruiz L., 1997).

*Pseudomonas aeruginosa* es la especie más importante del género *Pseudomonas*, fue aislada por primera vez de muestras ambientales por Schroetery col. (1972). *Pseudomonas* literalmente significa «falsa unidad», derivado del griego *pseudo* = falso y *monas* = una sola unidad. Y debido a que las colonia de *Pseudomonas aeruginosa* son pigmentadas, la denominación de la especie deriva de la palabra “aeruginoso” (aeruginous) que significa “El color del cobre oxidado”, reflejando el característico azul verdoso que presentan las colonias (Palleroni J., 2005).

Esta especie no forma parte de la flora bacteriana en individuos sanos, pero en caso que se encuentre, el tracto gastrointestinal es el lugar más frecuente de colonización de donde ha sido aislada en un 2 a 8% de individuos sanos (Hardalo C. y col., 1997).

Otros lugares húmedos del cuerpo también pueden ser colonizados, incluyendo la faringe, la mucosa nasal y zonas como las axilas y el perineo (en 2 a 10% de individuos). Las tasas de colonización son elevadas en individuos inmunosuprimidos u hospitalizados y en aquellos que presenten un epitelio pulmonar comprometido debido a fibrosis quística, así como los que han sufrido quemaduras severas ulceraciones o abrasiones mecánicas, cobrando así su importancia clínica (Torres A. y col., 1990 y Richards J. y col., 1999).

### 1.2.1 Posición Taxonómica

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Especie: ***Pseudomonas aeruginosa***

FUENTE: Garrity G. y col., 2004.

### 1.2.2 Morfología

Bacilo gram negativo, no formador de esporas puede presentar de 1.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y un diámetro de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$ , las especies de este género son móviles, la mayoría de células de *P. aeruginosa* presentan un único flagelo polar aunque en algunas ocasiones se han observado algunos aislados con dos o tres flagelos (Ruiz L., 2007).

La morfología colonial de esta especie puede ser bastante heterogénea, presenta dos tipos principales, una colonia alargada lisa y con centro elevado dándole una apariencia como de huevo frito (muestras clínicas), y a menudo puede presentar un característico brillo gris-plateado; un segundo tipo de colonia es pequeña rugosa y convexa, generalmente aisladas de ambientes naturales (Verón M. y col., 2005).

Un tercer tipo de colonia "mucoide" se obtiene a partir de muestras clínicas de secreciones del tracto respiratorio y urinario, consecuencia de la sobreproducción de alginato que es un polisacárido extracelular, entre las funciones del polisacárido se incluye el aumento de la resistencia a los antibióticos y la adherencia a las células epiteliales ya que el alginato forma una matriz que es parte del biofilm que forma *P. aeruginosa* en las vías respiratorias de los pacientes infectados (May B. y col., 1991).

### 1.2.3 Metabolismo

*Pseudomonas* es aerobio, utiliza oxígeno como aceptor terminal de electrones, pero algunas especies pueden crecer lentamente en condiciones anaerobias utilizando Nitrato ( $\text{NO}_3$ ) o arginina como aceptor final de electrones. Son oxidasa y catalasa positiva, no fermentadores de azúcar. La mayoría de especies del género, no crecen bajo condiciones ácidas (pH 4 o menor) (Palleroni J., 2005).

Las reacciones clásicas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos se encuentran en todas las especies de *Pseudomonas* que han sido examinadas. Una reacción clave es la síntesis de citrato a partir de oxalacetato y acetil-CoA, que está bajo el control de un sistema típico en organismos aeróbicos. El control de enzimas catabólicas periféricas (amidasa, histidasa, las enzimas de los compuestos aromáticos, y el metabolismo del alcanfor) por los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos son una manifestación de la posición central que ocupa en el metabolismo (Weitzman J. y col., 2005).

Una variedad de macromoléculas pueden ser degradadas por enzimas extracelulares de algunas cepas. Enzimas hidrolíticas como las proteasas han sido estudiadas al detalle en *P. aeruginosa*, y son importantes en las infecciones causadas por este microorganismo (Morihara K., 2005).

El catabolismo de carbohidratos en *Pseudomonas*, se caracteriza por no utilizar la ruta de Embden - Meyerhof debido a la falta del gen que codifica la 6-fosfofructoquinasa. En su lugar utiliza la ruta de Entner - Doudoroff que se descubrió en *P. saccharophila* en la que se obtiene gliceraldehido-3-fosfato y piruvato a partir de 6-fosfogluconato que es el intermediario clave (Del Castillo T., 2008).

En *Pseudomonas* la glucosa puede seguir dos vías para dar lugar a 6-fosfogluconato, las cuales se llevan a cabo en el periplasma:

- Vía fosforilativa en la cual la glucosa es transportada al citoplasma y fosforilada a glucosa-6-fosfato.
- Vía oxidativa que tiene lugar en el periplasma oxidando la glucosa a gluconato y 2-cetogluconato.

Aunque las vías fosforilativa y oxidativa están presentes en *P. aeruginosa* PAO1, se ha propuesto que las bacterias de esta cepa utilizan fundamentalmente la vía oxidativa en condiciones de aerobiosis y la vía fosforilativa cuando se cultivan bajo condiciones de anaerobiosis (Del Castillo T., 2008).

#### **1.2.4 Pigmentos y Sideróforos**

Una característica común en las *Pseudomonas* fluorescentes es la producción de pigmentos fluorescentes, muchos de estos actúan como sideróforos en los sistemas bacterianos de captación de hierro (Meyer M., 2000). Sin embargo no todas las especies de dicho grupo producen realmente pigmentos fluorescentes como por ejemplo *P. alcaligenes*, *P. mendocina* y *P. stutzeri* (Ruiz L., 2007).

Las *Pseudomonas* fluorescentes producen 6 tipos de pigmentos; piocianina, piorubina, piomelanina, clororafina y oxifenazina todas estas de naturaleza fenazínica, y el pigmento pioverdina, principal pigmento de todas las especies fluorescentes de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* y *P. putida*). Varios de los pigmentos fenazínicos pueden ser producidos por una única especie (Chang C. y col., 2005).

El más conocido y más característico es la fenazina piocianina, pigmento no fluorescente, identificado hace muchos años como la causa del color azul de la pus de las heridas infectadas con *P. aeruginosa*, la piocianina es un pigmento soluble en agua y cloroformo (Ledermann W., 2007). Este pigmento muestra propiedades antibióticas, antifúngicas y citotóxicas, por lo tanto contribuye a la patogénesis de *P. aeruginosa* como patógeno humano (Reszka K. y col., 2004).

Existen cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apiocianogénicas, que no producen pirocianina. Otras cepas menos frecuentes pueden sintetizar un pigmento rojo soluble en agua llamado piorrubina, un pigmento marrón-rojizo llamado piomelanina (Romero R., 2007).

La pioverdina es importante fisiológicamente porque funciona como principal sideróforo, su producción es mayor cuando hay limitación de hierro (Meyer M. y col., 1992). Todos los pigmentos pioverdina comparten un cromóforo quinoleínico relacionado a péptidos de diferente composición y tamaño, estos péptidos tienen una similitud a los péptidos cíclicos con propiedades antibióticas de las bacterias gram positivas, algunas cepas producen también pioquelina como sideróforo secundario (Georges C. y col., 1995; Merriman R y col., 1995).

### **1.2.5 Quorum Sensing (QS).**

En la naturaleza, muchas bacterias no viven como células individuales, los organismos pseudomulticelulares, coordinan su comportamiento poblacional por medio de pequeñas moléculas de señal extracelular (auto inductor). Bajo condiciones apropiadas, estas moléculas son liberadas al medioambiente y tomadas por las células circundantes (Fuqua C. y col., 2001).

“Quorum sensing”, es el sistema arquetipo de comunicación intercelular usado por muchas especies bacterianas para regular la expresión de genes en respuesta a la densidad celular, permitiendo un comportamiento coordinado y sinérgico en la población bacteriana (Fuqua C. y col., 1994).

Existen dos sistemas QS en *P. aeruginosa*, Las y Rhl ampliamente estudiados, el sistema Las que se compone de una proteína sintasa (LasI) y de un regulador transcripcional (LasR), LasI es esencial para la producción de la molécula AHL (N-3oxododecanoyl homoserina lactona), LasR requiere de esta molécula con el fin de convertirse en un regulador transcripcional activo para múltiples genes (Kiratisin P y col., 2002).

El segundo sistema QS, Rhl, se compone de las proteínas RhlI y RhlR, la proteína sintasa RhlI produce la AHL (N-butilil- L-homoserina lactona). Solo cuando el regulador transcripcional RhlR forma un complejo con este compuesto, estos regulan la expresión de varios genes (Pearson P. y col., 1999); Ambas N-acil homoserina lactonas (AHLs), N-3oxododecanoyl homoserina lactona y N-butilil- L-homoserina lactona, forman las moléculas señales principales en el sistema quorum sensing.

*P. aeruginosa* también produce otro tipo de señal extracelular, distintas a las AHLs que es 3-4-dihidroxi-2-heptilquinolona (PQS), cuya producción se da a finales de la fase de crecimiento exponencial, lo cual sugiere que PQS sirve como molécula señal secundaria en QS. PQS tiene como precursor inmediato al 4 hidroxil-2 heptilquinolona (HHQ) y este al ácido antranílico (Lepine F. y col., 2003).

PQS a pesar de no tener actividad antibiótica pertenece a la familia de las HAQs (4-hidroxil-2-alkilquinolonas) que son moléculas de bajo peso molecular con actividad antibiótica sintetizadas solo por *P. aeruginosa* (Pecsi C. y col., 1999).

Recientes estudios han identificado que en *P. aeruginosa*, existen alrededor de 39 genes que están altamente regulados por el QS incluyendo muchos genes de virulencia (Whiteley M. y col., 1999).

### **1.2.6 Plásmidos y Bacteriófagos**

Los plásmidos son componentes importantes de la composición genética de *Pseudomonas*. Algunos de ellos actúan como factores de fertilidad, algunos imparten resistencia a diversos agentes (plásmidos R), y otros confieren la capacidad de degradar carbono de inusuales fuentes, contribuyendo así a la versatilidad nutricional que es una característica notable de muchos géneros y en particular de *Pseudomonas*. Alguna de las propiedades codificadas por los plásmidos en *Pseudomonas* son (Kim S. y col., 1994):

- Uso de compuestos orgánicos que no se utilizan normalmente en el crecimiento de otras especies de *Pseudomonas* aeróbica.

- Resistencia a antibióticos, como carbenicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomina, tetraciclina, tobramicina, sulfonamidas.
- Resistencia a los agentes físicos y químicos (borato, cromato, varios iones metálicos, órgano mercuriales, telurito, radiación ultravioleta).
- Resistencia a propagación de bacteriófagos, interferencia con la lizogenización por algunos fagos temperados.
- Resistencia a bacteriocinas e inhibición de su producción.
- Transferencia de susceptibilidad hacia los bacteriófagos.
- Incompatibilidad con otros plásmidos.

Diferentes bacteriófagos líticos y lisogénicos fueron encontrados dentro del género *Pseudomonas*, particularmente en *P. aeruginosa* por ser un microorganismo ubicuo, esta importancia está reflejada en las 25 secuencias genómicas de bacteriófagos encontrados que infectan este microorganismo, cada uno con diferente tipo morfológico (Olsthoorn C. y col., 1995).

Generalmente los bacteriófagos en *Pseudomonas* son utilizados como un método de rastreo epidemiológico de una cepa específica (tipificación por fagos). En los últimos años se incremento el interés por los bacteriófagos de *Pseudomonas* y su secuencia genómica, impulsado por el interés renovado de la aplicación de terapia fágica, así como el uso de proteínas sintetizadas por estos (lisinas) para el tratamiento de la infección por *Pseudomonas* (Hertveldt K. 2008).

### **1.3 Bacteriocinas**

Los microorganismos producen una extraordinaria variedad de sistemas de defensa microbiana, estos incluyen antibióticos de amplio espectro, subproductos metabólicos, tales como los ácidos lácticos, agentes líticos como lisozima, exotoxinas de naturaleza proteica y bacteriocinas. Este arsenal biológicamente activo llama la atención por su diversidad y abundancia, hasta la fecha se han encontrado en casi todas las especies de bacterias (Tagg R. y col., 2002)

Una gran familia de antimicrobianos, las bacteriocinas definidas como fracciones proteicas que poseen acción bactericida, ha servido de modelo para diversas investigaciones relacionadas a su rol ecológico y evolución. Las bacteriocinas difieren de los antibióticos de amplio espectro en un punto crítico, ya que estos son tóxicos para las bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora. Estas toxinas se encuentran en todas las principales familias de bacterias, y por algunos miembros de la Archaea (Torreblanca M. y col., 1994). De acuerdo con Klaenhammer R. (1988), el 99% de todas las bacterias pueden sintetizar al menos una bacteriocina y la única razón de que no se han aislado es por la falta de interés en la búsqueda de estas toxinas por los investigadores.

Las bacteriocinas se describieron por primera vez en *Escherichia coli* y, posteriormente, en bacterias gram positivas (Riley A. y col., 2007).

### **1.3.1 Bacteriocinas en gram negativos**

Las bacteriocinas producidas por bacterias gram negativas son muy diversas, más de 30 bacteriocinas han sido identificadas en *Escherichia coli*. La diversidad presente en otras especies gram negativas, como en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* también muestran una alta frecuencia en la producción de bacteriocinas (30-50%) muchas de estas son similares a las colicinas en estructura y función, y comparten muchas características moleculares, evolutivas y ecológicas (Pugsley A. y col., 1987).

La denominación que reciben es específica del género o de la especie que las produce por ejemplo, klebicinas de *Klebsiella pneumoniae*, colicinas de *E. coli*, marcescinas de *Serratia marcescens*, y en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* son piocinas referido a su pigmento piocianina (Riley A. y col., 2007).

La bacteriocina mas estudiada es la colicina producida por *E. coli*. El grupo de genes de la colicina consta de tres genes estrechamente ligados, codificando las proteínas de toxina, inmunidad, y lisis, estos

genes se encuentran generalmente en los plásmidos. El gen de la toxina codifica la proteína con actividad bactericida a las células diana. El gen de inmunidad codifica la proteína que protege de la acción bactericida de su colicina contra células de su misma cepa. El gen de lisis codifica la proteína de lisis (también llamada proteína de liberación de bacteriocina), lisa la célula productora para liberar la bacteriocina fuera de la célula. La producción de colicina esta mediada por el regulón SOS y por lo tanto es producida principalmente en situaciones de estrés (Braun V. y col., 1994).

Estas proteínas necesitan de un receptor de superficie celular específico para su reconocimiento, y esta forma específica de reconocimiento propicia un rango filogenético relativamente estrecho de antagonismo frecuentemente referido para bacteriocinas. El modo de acción de las bacteriocinas varía desde la formación de poros en la membrana celular hasta la actividad nucleasa contra blancos de ADN, ARN, y ARNt (Riley A. y col., 2002).

Aun cuando las colicinas son representativas de bacterias gram negativas, estas difieren de otras bacteriocinas. En *E. coli* las colicinas están codificadas exclusivamente en plásmidos, mientras que las piocinas producidas por *P. aeruginosa*, han sido localizadas exclusivamente en el cromosoma. Las piocinas muestran similitud de secuencia a colicinas y otras bacteriocinas, aun no caracterizadas (Pugsley A. y col., 1987; Sano Y. y col., 1990). Las bacteriocinas de *Serratia marcescens*, cercanamente relacionadas a la familia de las colicinas, se localizan tanto en plásmidos como en cromosomas (Enfedaque J. y col., 1996).

Muchas bacteriocinas aisladas de bacterias gram negativas parecen haber sido creadas por recombinación entre regiones de ADN (del dominio estructural) que codifican las bacteriocinas existentes (Lau P. y col., 1992). En colicinas, el dominio central comprende alrededor del 50% de la proteína y está involucrado en el reconocimiento de

receptores específicos de superficie celular. El dominio N-terminal (aproximadamente 25% de la proteína) es responsable de la translocación de la proteína dentro de la célula blanco. El resto de la proteína alberga el dominio tóxico y la región de inmunidad, la cual es una secuencia corta involucrada en la unión a una proteína de inmunidad. Aun cuando, las piocinas producidas por *P. aeruginosa* forman un dominio estructural similar, los dominios de translocación y reconocimiento del receptor están cambiados (Sano Y. y col., 1993). La estructura de los dominios es responsable en gran medida de la diversidad de bacteriocinas que encontramos en la naturaleza.

Según el tamaño las bacteriocinas en bacterias gram negativas se pueden dividir en tres grupos:

- A. Bacteriocinas grandes similares a la colicina (25-80kDa): Proteínas de alto peso molecular, SOS inducibles (Braun V. y col., 1994).
- B. Microcinas más pequeñas (<10 kDa): Péptidos de bajo peso molecular similar a las bacteriocinas en gram positivas, No son SOS inducibles (Moreno F. y col., 2002).
- C. Bacteriocinas similares a la cola de fagos: Su estructura morfológica se asemeja a la cola de los bacteriófagos, son resistentes a nucleasas y proteasas. Matan a células sensibles por despolarización de la membrana celular (Nakayama K. y col., 2000; Strauch E. y col., 2003).

Estas últimas bacteriocinas fueron definidas como fagos defectuosos ya que se originaban a partir de fagos que se desarrollaron para funcionar como bacteriocinas. Por ejemplo, la piocina R2 (producida por *Pseudomonas spp.*) parece ser un remanente del fago P2, mientras que la piocina F2 es similar a la del fago lambda (Nakayama K. y col., 2000).

### 1.3.2 Bacteriocinas en gram positivas

Las bacteriocinas de bacterias gram positivas son abundantes y aún más diversas que las encontradas en bacterias gram negativas. Su espectro de inhibición puede ser en ocasiones bastante amplio, no siempre requieren de receptores específicos para su acción bactericida y sus determinantes genéticos pueden localizarse tanto en el cromosoma como en plásmidos (Jack W. y col., 1995).

Las bacteriocinas de gram positivas se diferencian de las gram negativas en dos aspectos fundamentales; Primero, la producción de bacteriocinas no es necesariamente un evento letal como ocurre en bacterias gram negativas. Esta diferencia crítica se debe a que las bacterias gram positivas poseen mecanismos de transporte para la liberación de la bacteriocina y algunas poseen un sistema de transporte específico de bacteriocinas, mientras otros emplean la vía de exportación dependiente de sec. En segundo término, las bacterias gram positivas han desarrollado una forma de regulación más compleja que el de las bacterias gram negativas (Jack W. y col., 1995).

Las bacteriocinas de bacterias gram positivas generalmente están limitadas a matar a otras bacterias gram positivas, pero su modo de acción puede variar significativamente, como por ejemplo se ha encontrado que lactococinas A, B y M solo mata a especies incluidas en su mismo género (*Lactococcus*), algunos tipos de lantibióticos, como la nisina y mutacina B-Ny266, han demostrado su acción bactericida contra una amplia gama de organismos, incluyendo *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, sin embargo también son activas contra bacterias gram negativas de importancia clínica como: *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, y *Neisseria* (Mota-Mera M. y col., 2000).

El grupo de bacterias especialmente rico en cepas productoras de bacteriocinas son las bacterias ácido lácticas (BAL). De acuerdo a sus

propiedades físico-químicas, tamaño, espectro de inhibición y presencia de aminoácidos modificados, las bacteriocinas de bacterias lácticas se han clasificado en 5 grandes clases (Cotter D. y col., 2005) (Tabla 1):

**Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas en bacterias gram positivas**

CLASE	SUBCLASE	BACTERIOCINA REPRESENTATIVA	BACTERIA PRODUCTORA
I Lantibiotico	I A	Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>
	I B	Mersacidina	<i>Bacillus spp.</i>
II No Lantibiotico	II A	Leucocina A	<i>Leuconostoc gelidum</i>
	II B	Lactocoquina G	<i>L. lactis</i>
	II C	Enterocina AS – 48	<i>Enterococcus faecalis</i>
	II D	Lactocoquina A	<i>L. lactis</i>
III. Clase		Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus,</i>
IV. Clase		Lactocina S	<i>Lactobacillus sakei</i>
V. Clase		Enterocina AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i>

Fuente: Cotter P. y col 2005.

#### 1.4 Piocinas de *Pseudomonas aeruginosa*

Francois Jacob (1954), fue el primero en describir una bacteriocina originada por *P. aeruginosa*, él demostró que tratando la cepa con un agente mutagénico (Luz Ultra Violeta ó Mitomicina C) esta producía un componente inducible, liberado por lisis bacteriana, el cual era adsorbido específicamente en la superficie celular de la bacteria susceptible (pertenecientes a la misma especie) y provocando su muerte. Por su analogía con las colicinas, Jacob las denominó piocinas. Kageyama y col. (1962) describen una piocina tipo R producida por *P. aeruginosa* cepa R. Takeya K. y col. (1967) describen otra piocina tipo F, finalmente Ito y col. (1970) reportan un tercer tipo de piocina llamada S (Michell-Briand Y. y col., 2002).

Piocinogenia, es la capacidad de producir piocinas, los niveles de producción de piocinas de forma espontánea es baja, y para incrementar los niveles de

producción los cultivos bacterianos deben ser tratados con agentes mutagénicos como el uso de radiación ultravioleta, o por la adición de Mitomicina C (1-2ug/ml) a cultivos en crecimiento activo (fase exponencial) (Michell-Briand Y. y col., 2002).

La acción bactericida de las piocinas envuelve un solo mecanismo, esta acción se debe a que se requiere de una sola molécula de piocina para actuar sobre una célula de *P. aeruginosa*. En piocina R1 es necesario 1 ó 2 moléculas de piocinas para una acción bactericida, mientras que para piocinas tipo F1 y S2 son necesarias 280 y 300 moléculas de piocinas respectivamente para cumplir esta acción. Las cepas piocinogénicas son insensibles a su propia piocina, aunque una excepción fue publicada. Las piocinas tipo R y F se producen en más del 90% de las cepas de *P. aeruginosa*, y la tipo S en un 70% de ellos (Smith W. y col., 1992).

La actividad bactericida de las piocinas en condiciones térmicas es otra de sus características. Las piocinas son estables a 40°, 50° y 60°C, pero a temperaturas superiores a 70°C es inactivada (Higerd T. y col., 1967; Sano Y. y col., 1981).

#### **1.4.1 Clasificación de piocinas**

##### **A. Piocina tipo R**

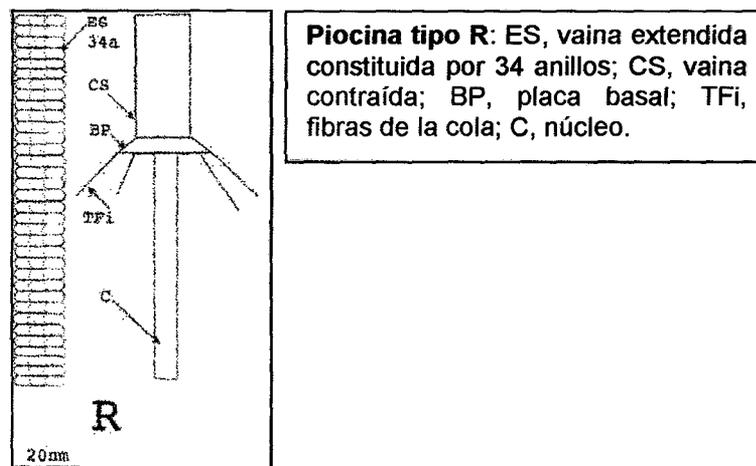
Es la primera piocina identificada, fue descrita por Kageyama y col. (1964). Es una partícula parecida a una barra semejante a la cola de un bacteriófago, producido por *P. aeruginosa* cepa R, todas las piocinas tipo R son nucleasa y proteasa resistentes. Esta propiedad, junto con otras, facilita la purificación de la piocina y la producción de antisueros específicos (Michell-Briand Y. y col., 2002).

##### **- Estructura de la piocina tipo R**

La estructura de varilla de la piocina tipo R corresponde a un doble cilindro hueco, que consiste en una vaina y un núcleo (120nm de largo, 15nm de ancho) (Fig. 1). La vaina está constituida por aproximadamente 200 subunidades proteicas dispuestas en una simetría helicoidal (34

anillos, cada anillo de seis subunidades, 3,5nm long. por vuelta), con capacidad de contracción. La longitud en la forma contraída es de 46nm de largo y 18nm de ancho y expone la parte del núcleo. El núcleo (constituido por aproximadamente 180 subunidades), ubicado dentro de la vaina tiene 120nm de longitud y es de 5,7nm de ancho. Una placa basal es visible en el extremo distal de la partícula y está acompañado de seis fibras de la cola. Las fibras consisten de una subunidad proteica en la que el C-terminal determina el subgrupo, existiendo así cinco subgrupos R1-R5. Todos estos detalles revelan un parecido morfológico entre la piocina R y la cola del fago T. Una bacteria puede llegar a producir unas 200 partículas de piocina tipo R (Michell-Briand Y. y col., 2002).

**Figura 1. Estructura de piocina tipo R**



Fuente: Michel-Briand Y. y col 2002.

#### - Receptor de la piocina tipo R

El receptor de las fibras de la cola está principalmente constituido de lipopolisacáridos (LPS). Es notable que algunas especies bacterianas pueden ser sensibles a piocina tipo R, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus ducreyi*, y *Haemophilus influenzae*. Lo cual sugiere que estas bacterias comparten receptores comunes con *P. aeruginosa* (Michell-Briand Y. y col., 2002).

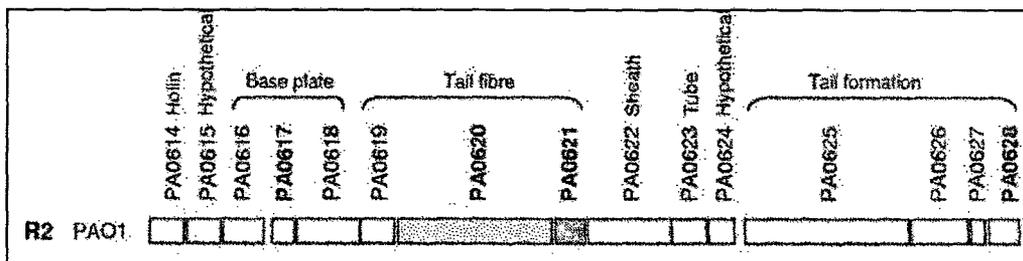
- **Actividad bactericida**

Una vez que la piocina tipo R es adsorbida por su receptor, el contacto es firme, y seguido por una rápida contracción de la vaina y la penetración del núcleo a través de la membrana externa, deteniendo la síntesis de macromoléculas en las células sensibles y liberando el material intracelular por la formación de poros, seguido por la muerte celular dentro de aproximadamente 20 minutos de ocurrido el contacto, como resultado de la despolarización de la membrana citoplasmática de al menos 90 mV (Uratani Y. y col., 1984).

- **Determinantes genéticos de la piocina tipo R**

Los genes para la piocina tipo R están localizados sobre un fragmento de 12156pb, en el cromosoma de *P. aeruginosa* cepa PAO1, cerca del gen *trpE* (al menos para piocinas tipo R1, R2 y R3). La secuencia de proteínas de la piocina R2 fue deducido por comparación entre la secuencia de los ácidos nucleídos en el genoma de *P. aeruginosa* cepa PAO1 (Fig. 2) y la secuencia del genoma del fago P2, y de esta manera es posible asignar funciones a cada ORF. La secuencia de proteínas para piocina R2 se codifica en 15 ORFs (PAO614 – PAO628), del ORF 16-18 para la placa basal, ORF 19-21 fibras de la cola, ORF 22 vaina, ORF 25-28 para la formación de la cola (Michell-Briand Y. y col., 2002).

**Figura 2. Organización genética de piocina R, en *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1**



La figura muestra los 15 ORFs codificados por el gen de la piocina R2 en la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y la función que cumplen en la conformación de cada parte de la piocina R.

Fuente: Kohler T. y col 2010

## B. Piocina tipo F

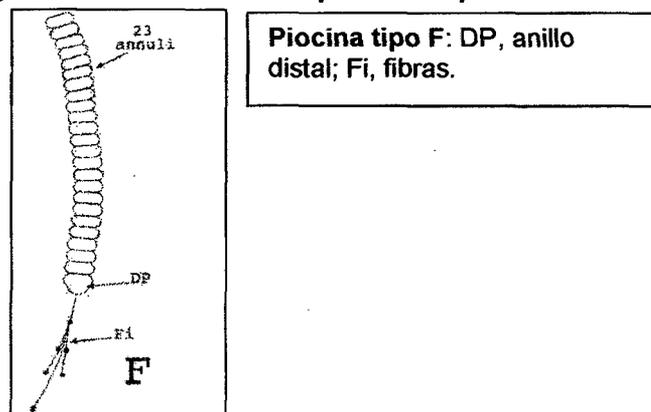
Identificado por Takeya y col. (1967), esta es también nucleasa y proteasa resistente, y bajo microscopía electrónica presenta una estructura de barra flexible, no contráctil y toma el nombre de piocina tipo F. Kuroda y Kageyama (1981) también describen otras partículas flexibles F1, F2 y F3. La piocina tipo F1 se produce en un nivel bajo, junto con piocina tipo R1 por *P. aeruginosa* cepa P15. Más tarde se encontraría la asociación con la piocina de tipo R (Michell-Briand Y. y col., 2002).

### - Estructura de la piocina F

Por análisis de microscopía electrónica, la piocina F1 (Fig. 3) aparece como una varilla flexible, no contráctil de 106nm de longitud, con un ancho uniforme de 10nm. Uno de los extremos es cuadrado, mientras que del extremo opuesto se extienden unas estructuras similares a fibras, con una longitud total de 43nm.

La parte de la varilla está constituida por 23 anillos (cada anillo está compuesto de una subunidad proteica de 19,5kDa). Las fibras están constituidas por varios filamentos cortos y largos cuya composición química determina la diferencia entre las piocinas F y la unión específica a la célula sensible. Las piocinas tipo F se asemejan a las colas de los fagos flexibles. La actividad específica de la piocina F es diferente de acuerdo a la cepa productora (Kuroda K. y col., 1981).

**Figura 3. Estructura de piocina tipo F**

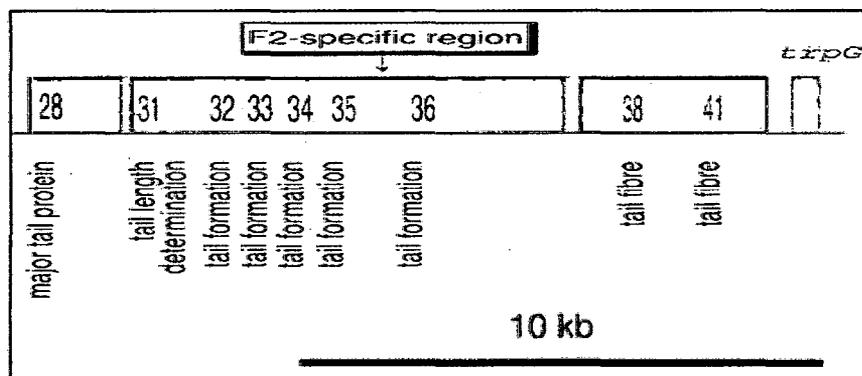


Fuente: Michel-Briand Y. y col 2002

- **Determinantes genéticos de la piocina tipo F**

Los determinantes genéticos en la cepa PAO1 para la piocina F2 se encuentran localizados entre los genes *trpE* y *trpG* (Fig. 4), más abajo de los genes para la piocina R2. La secuencia de la proteína del gen se deduce comparando las secuencias de ácidos nucleídos en el genoma de *P. aeruginosa* cepa PAO1, con la organización genética del fago Lambda ( $\lambda$ ), que corresponde a 16ORFs. 8 ORFs parecen estar implicados en la formación de la varilla, otros 6 ORFs constituyen un cassette que contiene genes duplicados en los cuales están presentes tres ORFs que participan en la formación de las fibras de cola (Nakayama K. y col., 2000).

**Figura 4. Organización genética de piocina tipo F**



Los números corresponden a la posición de los ORFs a partir de los genes de regulación (*prtN* and *prtR*), la transcripción va en dirección derecha – izquierda. Solo aparecen en la figura los ORFs (números marcados) que poseen funciones asignadas de la comparación con su fago (bacteriófago lambda). La línea oscura corresponde a un fragmento de 10 mil bases de nucleótidos.

**Fuente:** Nakayama K. y col., 2000.

**C. Piocina tipo S**

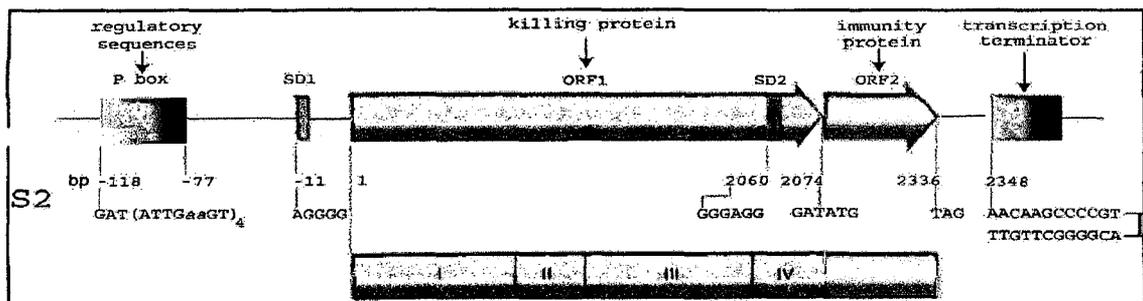
Ito S. y col, (1970), tratan una cepa productora de piocina tipo R con un suero anti-R y luego la someten frente a una cepa susceptible, mostrando una zona de inhibición amplia, el principio activo responsable de esta inhibición era una piocina soluble y sensible a proteasa, denominándola piocina tipo S, otros tipos de piocina fueron también identificados como: S2, S3, S4, S5, AP41 y Sa (Michell-Briand Y. y col., 2002).

- **Los dos componentes de piocina tipo S**

En la piocina tipo S se puede observar la presencia de dos componentes proteínicos asociados, los cuales se pueden separar por filtración en gel en presencia de urea. Este complejo proteínico está constituido por una proteína grande que muestra actividad bactericida y una proteína pequeña definida como la proteína de Inmunidad (Sano Y. y col., 1990). La actividad específica de la proteína grande es la misma como cuando está asociada a la proteína pequeña, lo que significa que ambos componentes están involucrados en un complejo (Seo Y. y col 1990).

**Proteína Bactericida:** Proteína de mayor tamaño, está constituida por 4 dominios que determinan su modo de acción (Fig. 5): El polipéptido N-terminal que contiene 240 aminoácidos, corresponde al dominio de unión al receptor denominado dominio I. El dominio siguiente, dominio II sin función aún no definida. El dominio III formado también por 240 aminoácidos, está implicado en la translocación a través de la membrana externa, y el dominio IV en el extremo C-terminal con 130 aminoácidos que posee la actividad DNasa (Sano Y. y col., 1993).

**Figura 5. Organización de dominios en la proteína bactericida**



La piocina S2 está constituida por dos ORFs, un ORF (ORF1) que codifica a la proteína bactericida, y otro ORF (ORF2) que codifica la proteína de inmunidad. La secuencia de regulación está constituida en la caja P y puede ser activado por la proteína PrtN

Fuente: Parret A. y col 2000.

**Proteína de Inmunidad:** Es el componente proteico de menor tamaño (formado por 87 a 153 aminoácidos) tiene como función otorgarles inmunidad a las células de *P. aeruginosa* frente a las

piocinas que producen. Esta protección se debe a la interacción entre el extremo N-terminal del componente más pequeño y la parte C-terminal del componente más grande (Sano Y. y col., 1993).

- **Actividad bactericida de piocina S**

Las piocinas tipo S (AP41, S1, S2, S3) causan la muerte celular por quiebre del ADN debido a la actividad endonucleasa situado en el extremo C-terminal de la proteína grande, sin embargo este componente no expresa ninguna actividad DNasa *in vitro* cuando está involucrada en el complejo. La proteína pequeña por lo tanto actúa como inhibidor, lo que confirma su papel como proteína de Inmunidad (Sano Y. y col., 1993).

Las piocinas S1 y S2 son capaces de inhibir la síntesis de fosfolípidos muy rápidamente (menos de 5min), bajo condiciones limitadas de hierro, esta inhibición está relacionada con la presencia del dominio DNasa, pero es independiente de la actividad DNasa. El grado de inhibición va en paralelo con la actividad bactericida. Este podría ser el principal evento de la acción de la piocina (Sano Y. y col., 1993).

- **Liberación extracelular de piocinas S**

Las piocinas tipo S se liberan de las células productoras como un complejo equimolar formado por la proteína de inmunidad y la proteína bactericida. Las piocinas tipo S no tienen ni una secuencia señal, ni secuencia similar con el gen que codifica la proteína de lisis en la colicina (como se muestra en el estudio del genoma en la cepa PAO1). Nakayama K. y col. (2000) sugieren que el sistema lítico responsable en la liberación de las piocinas es similar al observado en los bacteriófagos, este sistema se divide en dos partes que se encuentran a cada lado del locus R2 en la cepa PAO1. Este sistema está constituido por un gen que codifica una proteína que forma un canal acuoso hacia el periplasma y un gen lítico para alterar el mucopéptido, y es probable que este sea compartido por todas las piocinas tipo S (Nakayama K. y col., 2000).

### - **Receptor de piocinas tipo S**

Bajo condiciones limitadas de hierro ( $\leq 1 \text{ mMFe}^{2+}$ ), las piocinas S1, S2 y S3 son mejor absorbidas por células sensibles y provocan una muerte más eficiente. En estas condiciones limitantes de hierro, nuevas proteínas reguladoras de hierro (IROMPs) aparecen en la membrana externa de la cepa sensible, como la ferrioverdina, para las piocinas S1, S2 y S3, cuyo mecanismo de translocación es similar al que usan los ferrisideroforos (Schalk I. y col., 2001).

El receptor de la piocina AP41 pertenece a otro sistema donde el hierro también se ve involucrado. Siete genes están implicados en este fenómeno y sus productos están involucrados en la captación de piocina AP41, la expresión de estos genes se modulan tanto por la fase de crecimiento bacteriano como por la concentración de hierro (Duan K. y col., 2000).

### - **Determinantes genéticos de piocina S**

Los determinantes genéticos están localizados en el cromosoma de *P. aeruginosa*, estos están organizados en un operón compuesto por 2 ORFs, el primero codifica la proteína bactericida y el segundo la proteína de inmunidad. El sitio de unión del ribosoma para la traducción del gen de la proteína de inmunidad se encuentra en la región que codifica la porción carboxilo-terminal de la proteína bactericida, y está separado por sólo seis nucleótidos del codón de parada (TGA) de esta proteína, lo que permite que el ribosoma permanezca en contacto simultáneo con el codón de terminación de la primera proteína y el codón de inicio de la segunda. En estas condiciones, la transcripción de los dos ORFs se acopla y por lo tanto, se dan en la misma dirección, lo cual no ocurre en la transcripción de los genes que codifican la piocina S5 que es en sentido contrario (Sano Y. y col., 1993).

## 1.4.2 Piocinas: Características comunes

### A. Regulación de la síntesis de piocinas

Una secuencia reguladora denominada caja P (Fig. 6) se encuentra a unos 60 a 100pb por arriba del sitio de unión al ribosoma. Está constituida por una secuencia consenso 10-12 nucleótidos (ATTGnn (n) GTnn (n)) (Matsui H. y col., 1993).

**Figura 6. Secuencia de nucleótidos de la caja P**

S1	gattgcagtttgattgctgtgtatttccagtgattggcgttcatt	296-----	358	taggagatacatatg
S2	gattgaagttgattgcagtgattgocgatgcattggggcttatt	282-----	342	taggggcatctatg
AP41	gattgtagtttg.ttgtcgtgcatcgtcgtgcatcacogtttatt	441-----	537	taagggaaatatcatg
S3	catggtcgtgtggaggattgtagttgattggcgtgtgtgcaggtgcattggcgttg	60---	133	cgaggtaaaaactatg

Secuencia de nucleótidos de las cajas P en los genes de piocina S1, S2, AP41 y S3. La secuencia consenso (sombreado) attgnn(n)gtnn(n) se repite cuatro veces, y está involucrada en la regulación de piocinas por un activador transcripcional PrtN. Los números indican la posición de los nucleótidos.

**Fuente:** Michel-Briand Y. y col., 2002.

Un giro en la hélice de ADN contiene 10.6 nucleótidos, en donde las secuencias consenso pueden estar alineados en un mismo lado de la hélice del ADN, sirviendo como un sitio de unión para la proteína PrtN, el cual activa la transcripción de los genes de piocina (Matsui H. y col., 1993).

Dado que la producción de piocinas en *P. aeruginosa* es inducible por tratamientos que causan daño en el ADN, se propuso un sistema análogo al de *E. coli*. La síntesis de piocinas es dependiente del gen RecA, pero la caja P no comparte similar secuencia con la caja SOS en *E.coli* y el represor LexA tampoco está implicado en la síntesis de piocina (Sano Y. y col., 1993).

Estudios de piocinas en mutantes derivados de la cepa PAO, permitió identificar dos genes reguladores (Fig. 7). El gen *prtN*, codifica un regulador positivo PrtN (compuesta por 104 aminoácidos) que se une a las secuencias consenso de la caja P. El gen *prtR* codifica una

proteína represora PrtR (256 aminoácidos), que regula la disminución de la actividad promotora del gen *prtN* y presenta un sitio de escisión por la proteína RecA activa (Michell-Briand Y. y col., 2002).

**Figura 7. Mecanismo de regulación de la síntesis de piocina**

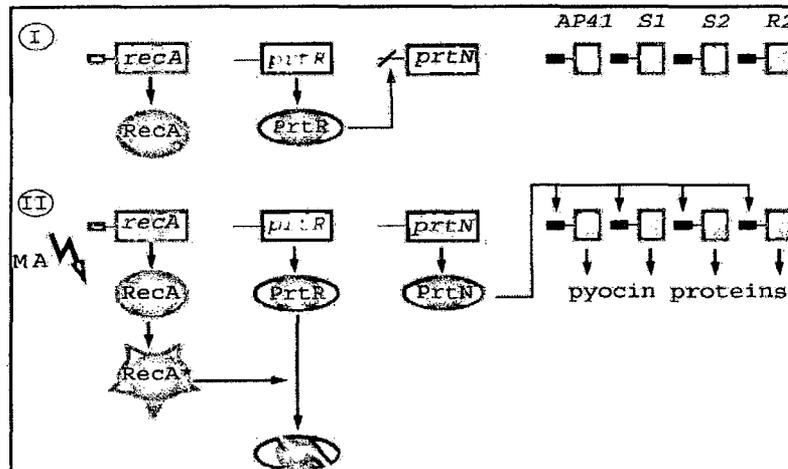


Fig. 7. Regulación de los genes de piocina. (I) En ausencia de inductor, muy pocas células producen piocinas porque la proteína activadora PrtN esta reprimida por la proteína PrtR (recA produce muy pocas moléculas de proteína RecA). (II) EN presencia de un agente mutagenico (MA), el daño al DNA incrementa la expresión del gen *recA* que codifica la proteína RecA, al mismo tiempo que la activa RecA\*, esta proteína se une al represor PrtR y libera la expresión de la proteína activadora PrtN, activando la síntesis de piocinas

Fuente: Matsui H. y col., 1993.

## B. Relaciones entre piocinas y bacteriófagos

Se observan similitudes fisiológicas entre las piocinas y bacteriófagos como: Inducción por agentes mutagénicos, la necesidad de un receptor, acción bactericida, etc. sin embargo hay una diferencia notable, las piocinas no se replican en las células sensibles. Existen analogías efectivas entre piocinas y fagos, la infectividad de algunos fagos es neutralizado por sueros anti piocina, también hay secuencias homólogas entre piocinas y fagos. Nakayama y col. (1962), compararon las secuencias de ADN de la cepa PAO1 de las regiones que contenían genes para R2 y F2 con los genes de los bacteriófagos P2 y del fago  $\lambda$ , respectivamente (Michell-Briand Y. y col., 2002).

Observaciones microscópicas muestran gran semejanza de las piocinas R con las colas inflexibles y contráctiles del bacteriófago P2, además que de los 14 ORFs identificados en la piocina R, 12 ORFs muestran importantes similitudes con los genes de la cola del fago P2 (Nakayama K. y col., 2000).

Mientras que las piocinas F se parecen a la cola flexible y no contráctil del bacteriófago  $\lambda$ . La región codificante de la piocina F2 contiene 8 ORFs mostrando marcadas similitudes con los genes de la cola del fago  $\lambda$ , así como una organización idéntica (Nakayama K. y col., 2000).

Sin embargo, no hay ni un gen para la formación de la cabeza, ni para la replicación y la integración. Por lo tanto las piocinas tipo R y F son considerados como las colas de los fagos que se convirtieron evolutivamente en bacteriocinas especializadas y no como simples fagos defectuosos (Nakayama K. y col., 2000).

### **C. Rol fisiológico de piocinas y su posible aplicación**

El papel fisiológico exacto desempeñado por piocinas, no es claro, las piocinas podrían asegurar el predominio de una determinada cepa en un nicho ecológico:

- En contra de otras bacterias de la misma especie, pero la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* son piocinogénicas.
- En contra de otras especies, pero el espectro de la piocina tipo S se limita a las cepas de *P. aeruginosa*.

Sin embargo, las piocinas tipo R, son capaces de matar a otras bacterias gram negativas. En todos los casos la producción se iniciará cuando las condiciones adversas provoquen daños en el ADN. Bajo estas condiciones por efectos de las piocinas, es más probable a preservar el predominio inicial de bacterias piocinogénicas en contra de células sensibles a piocinas, que a conquistar nuevos territorios de una población de células sensibles pre-existentes (Michell-Briand Y. y col., 2002).

El papel de piocinas en las enfermedades humanas es difícil de apreciar, parece que la piocianogenia aparece con mayor frecuencia en situaciones clínicas que en el medio ambiente y que la deficiencia de hierro favorece la acción de las piocinas S, como en pulmones de pacientes con fibrosis quística (Govan J. y col., 1986).

### **1.5. *Helicobacter pylori***

Durante décadas el tratamiento de la enfermedad ulcerosa péptica y otras enfermedades mayores del estómago fue sintomático. El descubrimiento de una causa infecciosa, el *Helicobacter pylori* por Warren y Marshall (1982), cambió completamente el manejo de estas enfermedades (Megraud F. y col., 2009).

En 1994 *H. pylori* fue reconocido por la International Agency Of Reserch on Cancer y la OMS como un carcinógeno categoría I (Ahmed N. 2005).

Las infecciones causadas por *H. pylori*, ha llegado a ocupar el segundo lugar de todas la enfermedades infecciosas que se conocen. Su incidencia está asociada al nivel socioeconómico de la población y antecedentes familiares de patologías gastroduodenales, entre otros (Forné M. 2001).

#### **1.5.1. Posición Taxonómica**

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Epsilonproteobacteria

Orden: Campylobacterales

Familia: Helicobacteraceae.

Género: *Helicobacter*

Especie: ***Helicobacter pylori***

FUENTE: Garrity G. y col., 2004.

### 1.5.2. Morfología

Es un bacilo gram negativo, en forma de S o bastón curvado y microaerofílico que mide de 0.5 - 1.0µm de ancho y 3µm de largo. Presenta de 4 a 6 flagelos (30µm) unipolares o bipolares recubiertos por una vaina rica en proteínas y lipopolisacáridos y ensanchados en su extremo distal, el núcleo del flagelo está constituido por un filamento, que en su extremo proximal aparece fijado a una matriz de naturaleza desconocida (Gamboa J. 2003).

El crecimiento en medio sólido a 37°C es lento y toma de 3 a 5 días para poder observar colonias circulares, con una apariencia convexa y translúcida y con un diámetro de 1 – 2mm. En la mayoría de los casos las colonias están rodeadas por una zona ligera de hemólisis (Forné M. 2001).

### 1.5.3. Metabolismo

*H. pylori* es un microorganismo microaerófilo obligado, sin embargo la glucosa parece ser el único carbohidrato utilizado por este microorganismo y existe evidencia de su metabolismo por vía oxidativa y fermentativa (Mendz G. y col., 1993).

El metabolismo de la glucosa se realiza en dos fases; una etapa inicial lenta seguida de un rápido catabolismo. Las tasas de disminución de los niveles de glucosa en ambas fases dependen de las condiciones de crecimiento de las bacterias, lo que sugiere que este metabolito no es el sustrato de energía preferido, pero se puede utilizar cuando otras fuentes de energía se han agotado (Mendz G. y col., 1993).

Mendz y Hazell (1991), demostraron la presencia de actividad enzimática en los pasos oxidativo y no oxidativo en la vía pentosa-fosfato, pero según el análisis genómico en el ADN, este microorganismo no sintetiza el 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzima clave, pero si fue encontrada una proteína con función similar y características diferentes a 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

Alternativamente, la glucosa-6-fosfato es utilizada por la vía de Entner - Doudoroff, considerado como una alternativa a la glucólisis, los pasos específicos de esta vía consiste en dos reacciones: formación de 2-ceto-3-desoxiguconato-6-fosfato a partir de glucosa-6-fosfato; y una aldolasa que cataliza la producción de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato (Mendz G. y col., 1991).

#### 1.5.4. Características bioquímicas

##### - Ureasa

*H. pylori* dispone de un amplio arsenal enzimático dentro de él se incluye la ureasa, enzima que sirve de escudo protector para enfrentar los efectos letales de la acidez gástrica. La ureasa le otorga un entorno básico (amonio) para sobrevivir a los efectos del ácido clorhídrico propio del mucus gástrico (Forné M. 2001). La enzima ureasa capacita a *H. pylori* para la colonización y persistencia en la cavidad gástrica, aumentando el pH alrededor de 3 a 7, el óptimo para su crecimiento. Se localiza tanto en la membrana externa como en el espacio periplásmico y está compuesta por complejos de una estructura hexamérica. Se ha comprobado que mutantes lisogénicos carentes de la enzima son incapaces de colonizar animales de experimentación (Alarcón T. y col., 2004).

La potencia de la ureasa es muy superior a la de otras bacterias, incluida *Proteus spp.* La enzima cumple tres funciones principales: protección frente al ácido de la mucosa gástrica, provisión de nitrógeno en forma de amonio y como factor de virulencia en la patogenia de la úlcera gástrica (Alarcón T. y col., 2004).

- **Catalasa**

Enzima producida por *H. pylori* que desempeña una función importante como factor de virulencia, favorece la sobrevivencia de la bacteria en el tejido inflamado, la protege de las acciones fagocíticas de los neutrófilos, de los metabolitos reactivos de oxígeno (MRO) y la de otros mediadores químicos de la inflamación (Piñol F. y col., 1999). Esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) y la convierte en agua liberando oxígeno, el cual en una prueba de laboratorio se visualiza como producción de burbujas (Alarcón T. y col., 2004).



- **Oxidasa**

La oxidasa es una enzima del grupo que se denominan oxidorreductasas y producen la oxidación por adición del oxígeno a un metabolito o de la eliminación del hidrógeno o de uno o más electrones. La oxidasa se encuentra en altas concentraciones dentro del citoplasma de *H. pylori*, utilizada por dicho microorganismo como mecanismo de defensa contra el ataque fagocítico de los neutrófilos. Actúa como antioxidante al catalizar los metabolitos reactivos de oxígeno producidos por los neutrófilos, que pudieran dañarla. Estos hallazgos sugieren que *H. pylori* posee sus propios mecanismos de defensa que contribuyen a su acción patogénica sobre la mucosa gástrica (Piñol F. y col., 1999).

### **1.5.5. Modos de transmisión**

El mecanismo de transmisión es una de las incógnitas más trascendentales de la epidemiología del *H. pylori* ya que impide la posible aplicación de medidas preventivas. Hay pruebas que sugieren la transmisión persona-persona, este modo de transmisión está apoyado

por el grupo de casos presentados dentro de familias, la similitud de los genotipos encontrados entre los aislados de personas relacionadas y el fracaso para encontrar una evidencia definitiva de un reservorio medioambiental (Wang J. 1993)

En los países en desarrollo, la transmisión fecal - oral de *H. pylori* por alimentos contaminados o de suministro de agua parece ser un medio probable de propagación, ésta bacteria ha sido aislada de la placa dental, saliva y vómito (Parsonnet J. y col., 1999). Aunque estos microorganismos nunca han sido cultivados a partir de fuentes medio ambientales, los métodos moleculares e inmunológicos se han utilizado para detectar el ADN en fuentes de agua contaminada. Sin embargo, el mecanismo por el cual se transmite *H. pylori* a partir de un huésped a otro sigue siendo especulativo (Hegarty J. y col., 1999).

#### **1.5.6. Prevalencia**

La prevalencia de *H. pylori* difiere en el mundo, llegando hasta el 30% en los países desarrollados y cerca del 90% en los países en vías de desarrollo (Everhart J. y col., 2000). En el Perú los estudios de la epidemiología del *H. pylori* se vienen realizando desde hace más de dos décadas.

En los años ochenta no se encontró diferencias de la prevalencia global entre poblaciones procedentes de niveles socioeconómicos alto y bajo, la variación de la prevalencia en nuestro país se observa al comparar los reportes desde hace más de 10 años, entre el 70 y 80% con la que actualmente detectamos en Lima (50%) (Ramírez A. y col., 1992). Por otro lado, existe una diferencia en la prevalencia de la infección por *H. pylori* entre los estratos socioeconómicos bajo y alto, un estudio en la población peruana de nivel socioeconómico bajo reporta una prevalencia de más del 80%, en comparación al 58.3% procedente de nivel medio y alto en el periodo 2000 – 2002 (Ramírez A. 2002). Basados en estas evidencias, podemos afirmar que la prevalencia de la infección está disminuyendo en los estratos socioeconómicos medio y

alto, permaneciendo estable en poblaciones de nivel socioeconómico bajo.

### **1.5.7. Resistencia**

La mayoría de las terapias establecidas para *H. pylori* logran su erradicación y se obtienen buenos resultados en el tratamiento de las enfermedades gastroduodenales, la mejor terapia de erradicación para obtener esta respuesta ha sido la terapia triple que consiste en la administración de al menos 2 antibióticos (amoxicilina, claritromicina o metronidazol) y una droga que disminuye la secreción gástrica como los inhibidores de la bomba de protones, o el uso de un antagonista de los receptores de H<sub>2</sub>. La resistencia a los medicamentos antimicrobianos es una de las principales causas de fracaso del tratamiento en *H. pylori* y es en gran parte responsable de la disminución de las tasas de erradicación (Cisneros S. 2009).

La prevalencia de la resistencia en los diferentes países varía según la población y su nivel socioeconómico, los antibióticos que presentan mayor resistencia son el metronidazol y claritromicina. Metronidazol es el antibiótico que presenta mucha resistencia, en la India se ha reportado un 90% de resistencia (Cisneros S., 2009), en EE.UU. y Europa el 50% y en el Perú 52%. Claritromizina reporta tasas crecientes de resistencia, en Brasil el 7%, en EE.UU entre el 7-14 %, y en Perú 27% (Ramírez A., 2010).

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1. MATERIALES

##### 2.1.1 Material Biológico

- ❖ Cepas *Helicobacter pylori*: Obtenidas del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción – Chile (Anexo 8).

- ATCC 43504
- G27
- J99

- ❖ Cepas *Pseudomonas aeruginosa*: Se utilizo un total de 32 cepas de *P. aeruginosa*, 8 de las cuales son de origen agua, 12 de origen suelo y 12 de origen clínico.

Las cepas de origen agua y clínico proceden de trabajos de investigación realizados anteriormente en el Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas UNSAAC – Perú.

Las cepas de origen suelo fueron aisladas de cultivos agrícolas entre los meses de diciembre 2010 y enero 2011.

La cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 se obtuvo del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción - Chile.

- ❖ Otras cepas Bacterianas: Cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, cepa *Salmonella typhi* ATCC 13076, cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción – Chile.

### **2.1.2 Medios de Cultivo**

- ❖ Agar Cetrimide (Merck)
- ❖ Agar P para Pseudomonas (Oxoid)
- ❖ Agar F para Pseudomonas (Oxoid)
- ❖ Agar Columbia (Merck) con sangre desfibrinada de caballo al 5% y suplemento DENT (Oxoid)
- ❖ Agar Muller – Hinton (Merck)
- ❖ Agar Nutritivo (Merck)
- ❖ Caldo BHI (Merck)

### **2.1.3 Discos de sensibilidad**

- ❖ Amikacina (Arlab Chile)
- ❖ Gentamicina (Arlab Chile)
- ❖ Ciprofloxacino (Arlab Chile)
- ❖ Cefoperazona (Arlab Chile)
- ❖ Ceftazidima (Arlab Chile)

### **2.1.4 Material para PCR y visualización**

- ❖ Primers PA0617-R y PA0617-L (Eurofins)
- ❖ Primers PA0628-R y PA0628-L (Eurofins)
- ❖ Kit PureTaq Ready-To-Go (GE Healthcare)
- ❖ RedGel 1000x (Biotium)
- ❖ Agarosa (Bioaxis)
- ❖ Tampón Tris Acetato EDTA (TAE) 10X

### **2.1.5 Equipos**

- ❖ Termobloque (Lab-line)
- ❖ Termociclador (Thermo)
- ❖ Cámara electroforética (Thermo)

- ❖ Cabina de Flujo laminar clase II (Esco)
- ❖ Micro centrifuga (Thermo)
- ❖ Incubadora a 37°C (Binder)
- ❖ Incubadora a 37°C con atmosfera de CO<sub>2</sub> al 10% (Binder)
- ❖ Transiluminador U.V. (Thermo)
- ❖ Refrigeradora (Mabe)

### 1.2.6 Otros materiales

- ❖ Filtro para jeringa Acrodisc 0.2 µm (Pall)
- ❖ Escala de McFarland 0.5, 1 y 2
- ❖ Suero Fisiológico 0.9%
- ❖ Micropipetas (Boeco)

## 2.2. METODOS

### 2.2.1 Obtención de *Pseudomonas aeruginosa* de origen suelo

a) **Método de muestreo.** Las muestras provenían de cultivos agrícolas aledaños al río Huatanay, el recorrido a efectuar en la toma de muestra se realizó siguiendo un esquema sinuoso para cultivos agrícolas. Se eligieron 12 áreas de muestreo, de cada área se obtuvo 5 muestras de suelo.

Las muestras se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Fulthorpe R. y col., 1996:

- En cada punto elegido se eliminó la cobertura vegetal y se limpió la superficie del suelo descartando todo lo que sea rastrojo o restos de césped.
- Con una pala se efectuó cortes en V, hasta unos 15-20cm de profundidad. La primera palada fue eliminada, de una segunda palada de 3 cm de grosor aproximado, se descartó los bordes y se colocó la muestra en bolsa estéril.

- Cada muestra de 30gr aproximadamente fue rotulada y llevada al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNSAAC – Perú, para su posterior procesamiento.

#### **b) Aislamiento e Identificación:**

El aislamiento de *P. aeruginosa* se realizó siguiendo la metodología descrita por Green S. y col., 1974; García A., 1981:

- 10 gr. de la muestra de suelo previamente mezclada fue colocada en un frasco conteniendo 90ml de agua destilada estéril (dilución  $10^{-1}$ ).
- Se agitó el frasco durante 15 min y sin dejar que las partículas de suelo sedimenten se realizó diluciones sucesivas hasta llegar a una dilución  $10^{-5}$ .
- Se tomó una asada de la muestra y se sembró en agar Cetrimide, las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 18-24 hrs.
- Las colonias que presentaron pigmentos amarillo-verdoso y/o verde-azulado fueron elegidas para su identificación.
- La identificación del género y especie se realizó por las pruebas de catalasa, oxidasa, licuefacción de la gelatina, presencia de pigmento piocianina y crecimiento a  $42^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.2.2 Obtención de *Pseudomonas aeruginosa* de origen agua y clínico**

Se incluyeron en la investigación 8 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras de agua las cuales se obtuvieron del trabajo de tesis titulado “Resistencia a metales pesados y antibióticos, de *Pseudomonas spp.* aislados de los ríos Salado y Cañipia – Espinar – Cusco” (Dueñas C. y col., 2010) y 12 muestras de *P. aeruginosa* de muestras clínicas obtenidas del trabajo de tesis titulado “Colonización bacteriana y resistencia a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislados de pacientes de la unidad de quemados del Hospital Regional Cusco” (Ojeda K., 2011).

Estas cepas se mantuvieron en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el cepario de las instalaciones de la DIRESA – Cusco. Se reactivaron tomando una

muestra del cepario e incubándolas en caldo BHI a 37°C por 24hrs, y un posterior subcultivo en agar Cetrimide.

### **2.2.3 Conservación, transporte y reactivación de cepas**

Las cepas empleadas por este estudio fueron trasportadas del Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas UNSAAC – Perú al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción - Chile; empleando el método de conservación descrito por Kirsop B. y col., 1991.

- Las cepas fueron cultivadas en caldo BHI por 24h a 37°C, a partir del cual se tomaron 100µl y se suspendieron en 2ml de caldo BHI.
- Con ayuda de un asa de siembra, los inóculos fueron impregnados en tiras de papel filtro estéril.
- Se dejaron secar al aire en condiciones estériles y se colocaron en bolsas estériles selladas adecuadamente.
- Se reactivaron colocando las tiras de papel filtro en 5ml de caldo BHI e incubándolas a 37°C.

A partir de este ítem, todos los procedimientos fueron realizados en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción Chile.

### **2.2.4 Caracterización de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa***

- a) Susceptibilidad antibiótica:** La sensibilidad de las bacterias se realizó siguiendo el método de disco difusión descrita por Kirby-Bauer:
- Se realizó la siembra de las cepas de *P. aeruginosa* sobre agar Muller-Hinton, a partir de una suspensión en suero fisiológico con turbidez a la escala 0,5 de McFarland.
  - Posteriormente se colocaron los discos de los diferentes antibióticos en la superficie del agar con ayuda de una pinza estéril, se llevo las placas a incubación por 18 a 24hrs y se realizó la lectura midiendo los diámetros de los halos en milímetros.

Los antibióticos utilizados en este estudio pertenecen a los recomendados en el “Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método disco difusión” MINSA – 2002, los antibióticos son: amikacina, gentamicina, ciprofloxacino, cefoperazona, ceftazidima.

**b) Producción de pigmentos:** Para evaluar la producción y tipos de pigmentos se siguió la metodología descrita por King y col., 1954, empleando agar P y agar F para *Pseudomonas*:

- Las cepas de *P. aeruginosa* se cultivaron en caldo BHI por 18hrs.
- Un inóculo de éstas fue sembrado en agar P y agar F para *Pseudomonas* e incubados a 37°C durante 24h.
- Se realizó la lectura de tipo de pigmentos a las 24, 48 y 72h.

#### **2.2.5 Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori***

**a) Obtención del extracto crudo:** Para inducir a la producción de piocinas en las cepas de *P. aeruginosa* se recurrió a la metodología descrita por Higerd T. y col., 1967:

- A partir de cultivos de *P. aeruginosa* en caldo BHI de 18h, se realizó una suspensión en suero fisiológico hasta alcanzar una O.D. correspondiente a McFarland N°2.
- De la suspensión anterior se extrajo 50µl en 5ml de caldo BHI y se incubó a 37°C hasta alcanzar una turbidez Mcfarland N°1, correspondiente a un O.D. (625nm) 0.2.
- Utilizando placas petri los cultivos fueron vertidos en estos y expuestos a irradiación UV (15W) durante 45seg a una distancia de 50cm de la lámpara.
- Se recogieron los cultivos y se llevaron nuevamente a incubación durante 3h.

- Los cultivos se centrifugaron a 10000rpm durante 10min, los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados utilizando filtros de membrana de 0.2µm de diámetro de poro, producto denominado extracto crudo.

**b) Inhibición por el método difusión radial:** Para realizar la inhibición de *H. pylori* por los extractos crudos de *P. aeruginosa*, se recurrió al método descrito por Sgouras y col., 2004:

- Se realizaron pozos de 6mm de diámetro (utilizando pipetas Pasteur) en placas con 20ml de agar Columbia suplementado con sangre desfibrinada de caballo (5%), sin DENT.
- Se tapizó la superficie del agar con ayuda de una torunda estéril, utilizando una suspensión de *H. pylori* a McFarland N°2.
- En cada pozo se depositaron 50µl de cada extracto crudo de *P. aeruginosa*, como control negativo se utilizó caldo BHI estéril.
- Las placas fueron incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia por 72h y se realizó la lectura midiendo los diámetros de halo de inhibición en milímetros (mm).

## 2.2.6 Caracterización de los extractos crudos

Los extractos crudos de las cepas de *P. aeruginosa* que mostraron actividad inhibitoria frente a *H. pylori* fueron seleccionados para las pruebas de caracterización, utilizando la metodología descrita por Gecele G., 2010.

### a) Termotolerancia:

Se distribuyeron alícuotas de 1ml de los extractos crudos de *P. aeruginosa* en eppendorfs y se sometieron a diferentes temperaturas (60, 90 y 120°C) por 30min empleando un termobloque.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizó las pruebas de inhibición por el método difusión radial, como control se utilizó los extractos crudos sin tratamiento térmico.

**b) Sensibilidad enzimática:**

Se distribuyeron alícuotas de 1ml de los extractos crudos de *P. aeruginosa* en eppendorfs, a cada muestra se le agregó tripsina a una concentración final de 2mg/ml (disuelta en Buffer fosfato de potasio 0.01M, pH 7.2), y se incubó a 37°C por 2h.

Posteriormente la inactivación de la enzima se realizó sometiendo las muestras a 65°C por 30min.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizó las pruebas de inhibición por el método difusión radial, como controles se utilizó BHI estéril con tripsina desactivada, y los extractos crudos sin tratamiento enzimático.

**2.2.7 Identificación molecular de genes de piocinas tipo R por PCR múltiple.**

La detección de piocinas tipo R en las cepas de *P. aeruginosa* con efecto inhibitorio frente a *H. pylori* se realizó por la técnica de PCR múltiple empleando los primers (tabla 2) diseñados por Köhler, T. (2010):

**Tabla 2. Primers para la detección molecular de piocinas R**

Primers	Secuencia 5'-3'	Región Amplificada	Tamaño del amplicón
PAO617-R	ACTCGCACGGCAGACAATCC	Placa Basal	204pb
PAO617-L	CGGCCTGGCTCATCTTAAACA		
PAO628-R	CTCTCCACGGCTGGTATAGAGG	Fibras de la cola	162pb
PAO628-L	CTTCGACGTTACCTTCGACGAC		

Fuente: Elaboración propia.

**a) Extracción de ADN:** El ADN bacteriano se extrajo siguiendo el método descrito por Mazurier y col., 1992:

- Se tomaron de 3 a 5 colonias a partir de cultivos de *P. aeruginosa* en agar nutritivo, se suspendieron en 500µl de suero fisiológico y se centrifugaron a 5000rpm por 5min.

- Se eliminó el sobrenadante y se repitió este paso dos veces para lavar las células.
- El pellet se resuspendió en 500µl de agua libre de nucleasas y se calentó a 95-100°C en termobloque por 10min.
- Luego, se centrifugó a 14000rpm por 5min y el sobrenadante que contiene el ADN se almacenó a -20°C hasta su utilización.

#### **b) Condiciones de la PCR**

La mezcla de amplificación se realizó utilizando el Kit PureTaq Ready-To-Go (GE Healthcare), en cada eppendorf se colocó 2.5µl de cada par de primers, 10µl del templado de ADN y 10µl de agua libre de nucleasas, haciendo un volumen final de 25µl.

La amplificación por PCR múltiple se realizó siguiendo el esquema señalado por los autores para los primers utilizados; que fueron los siguientes:

Etapa 1: Denaturación a 95°C por 2min

- Etapa 2  $\rightleftarrows$  27 ciclos
  - Denaturación a 95°C por 20seg
  - Hibridación a 57°C por 30seg
  - Elongación a 72°C por 1min
- Etapa 3: Extensión final a 72°C por 4min

Finalizada la reacción las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su análisis.

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.6%(p/v), el cual se preparó con Tampón Tris Acetato TAE 10X y 1.5ul de GelRed 3X.

La siembra en el gel se realizó con la mezcla de 10µl de amplicón y 2µl de Tampón de Carga 2X. Los geles fueron corridos a 90 voltios durante 1h, para la visualización se utilizó un transiluminador.

### **2.2.8 Cinética de crecimiento y actividad inhibitoria de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 12S**

La cinética de crecimiento se realizó siguiendo la metodología recomendada por CLAHP, 2007:

- A partir de un cultivo de 18-24h ( $10^8$  ufc/ml), se suspendió 300ul del cultivo en 300ml de caldo BHI ( $10^5$  ufc/ml).
- La suspensión se distribuyó en tubos de 10ml y se llevó a incubación a 37°C.
- Cada 2h durante un tiempo total de 32h, se tomó un tubo del cual se extrajeron 2 sub muestras:
  - o Primera muestra: Lectura de la densidad óptica (O.D.) en espectrofotómetro a 625nm
  - o Segunda muestra: Se centrifugó 5ml a 10000rpm durante 10min y se filtró el sobrenadante, el cual fue empleado para las pruebas de inhibición frente a *H. pylori*

### **2.2.9 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Para determinar la CMI, se realizaron diluciones seriadas (v/v) del extracto crudo en suero fisiológico 0.9% (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64), posteriormente se realizaron las pruebas de inhibición siguiendo el método de difusión radial.

La concentración más baja que mostró un halo de inhibición visible se determinó como la concentración mínima inhibitoria.

### **2.2.10 Cinética de muerte de *Helicobacter pylori* ATCC 43504**

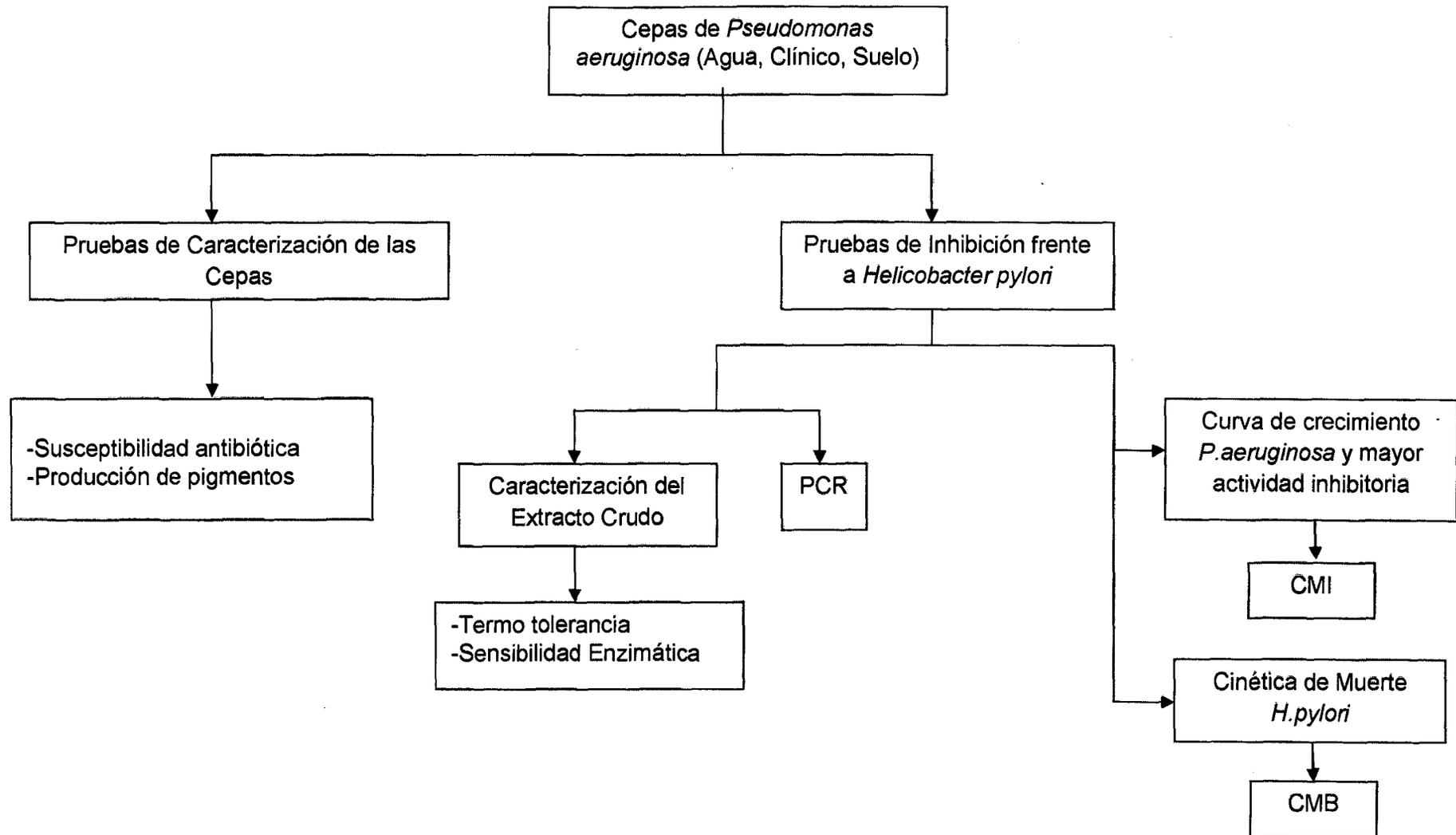
La cinética de muerte de *H. pylori* se llevó a cabo siguiendo la metodología empleada por Flamm R., y col., 1996:

- El inóculo inicial se preparó de una suspensión de *H. pylori* con una turbidez McFarland N°2, 300ul de esta suspensión se añadió a 30ml de caldo BHI suplementado con suero sanguíneo al 10% y un volumen de

extracto crudo para llegar a las concentraciones finales de CMI y 2xCMI (datos obtenidos del procedimiento 2.2.9), cuidando que los volúmenes finales sean iguales (30ml). Como controles se utilizó un cultivo *H. pylori* en caldo BHI suplementado con suero sanguíneo al 10%, y otro con amoxicilina (0.12ug/ml). Los cultivos son incubados a 37°C en condiciones de microaerofilia.

- El recuento de células viables se realizó a distintos intervalos de tiempo (0, 2, 4, 7, 10 y 24h) utilizando la técnica de la microgota. Se tomó una alícuota del cultivo de *H. pylori* y se realizó diluciones seriadas, se extrajo 20µl y se colocó a manera de gotas sobre la superficie de una placa conteniendo agar Columbia con sangre de caballo desfibrinada al 5% y suplementado con DENT, dejando por unos minutos a que las gotas sequen.
- Las placas son incubadas en condiciones de microaerofilia durante 3 días a 37°C y se realizó el recuento en UFC x ml.

### 2.3 FLUJOGRAMA DE TRABAJO



FUENTE: Elaborado en base a los objetivos planteados.

### CAPITULO III

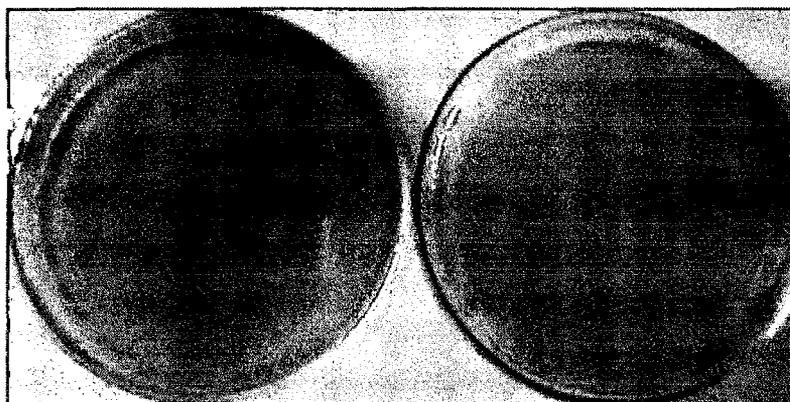
#### RESULTADOS Y DISCUSION

##### 3.1 Aislamiento e Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de muestras de suelo

De acuerdo a la metodología, a partir de 60 muestras procesadas provenientes de cultivos agrícolas se obtuvieron 22 cepas de *Pseudomonas spp.* utilizando medio de cultivo agar Cetrimide. Estas cepas fueron identificadas por presentar una pigmentación verde-amarillo y/o verde-azulado difusible en el medio como se observa en la figura 8, bajo microscopia se observaron bacilos alargados gram negativos, las pruebas bioquímicas fueron catalasa positivos, oxidasa positivos y licuefacción de gelatina positivos.

De las 22 cepas aisladas, 12 fueron identificadas como *P. aeruginosa* por haber presentado crecimiento a 42°C en 24h, y pigmentación verde-azulado en agar Cetrimide. La presencia del pigmento verde-azulado (piocianina) fue evaluada hasta 2 días post incubación, a temperatura ambiente. Como control en las pruebas se usó la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 (anexo 1).

**Figura 8. Desarrollo de cepas *Pseudomonas spp.* en agar Cetrimide**



*Pseudomonas spp.* con producción de pigmento verde-azulado (izquierda) y pigmento verde-amarillo (derecha)

En la tabla 4, se observa el porcentaje de cepas resistentes de *P. aeruginosa* para cada hábitat frente a los antibióticos ensayados, amikacina 30µg, gentamicina 10µg, ciprofloxacina 5µg, cefoperazona 75µg y ceftazidima 30µg. El comportamiento de las 32 cepas de *P. aeruginosa* frente a cada antibióticos puede observarse en el anexo 2.

De acuerdo a estos resultados podemos observar que en general la resistencia se observa en aquellos aislados de origen clínico y agua, así mismo es notable observar que las cepas de suelo presentaron susceptibilidad en un 100% frente a todos los antibióticos ensayados.

### 3.3.2 Producción de pigmentos

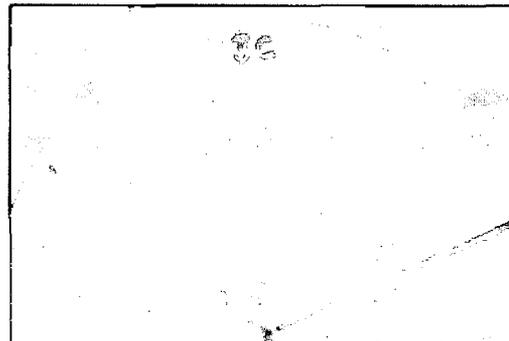
Para evidenciar la producción y tipo de pigmentos, se emplearon los medios agar P y agar F. Agar P (figura 9A) para pigmentos verde-azulados (piocianina), y/o marrón-rojizo (piorrubina o piomelanina); agar F (figura 9A) para el pigmento verde-amarillo fluorescente (pioverdina).

De las 32 cepas ensayadas, el 100% mostró producción de pigmento verde-azulado (piocianina), la cual se evidenció con mayor claridad al dejar las placas de 1 a 2 días post incubación, a temperatura ambiente; las cepas también desarrollaron un pigmento marrón-rojizo (piorrubina o piomelanina), que fue fácilmente reconocible y en muchos casos interfirió con la lectura del pigmento piocianina; el pigmento fluorescente pioverdina presente en el 62.5% fue evaluado bajo luz ultravioleta, empleando un transiluminador (anexo 3).

**Figura 9A. Pigmentos en agar P y agar F**



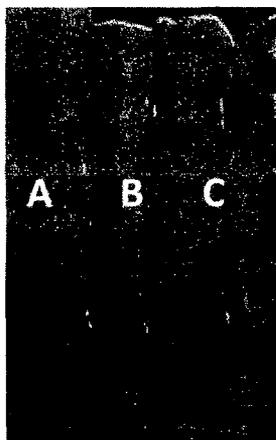
Crecimiento de *P. aeruginosa* cepa 3C en agar P y producción del pigmento piocianina (verde-azulado)



Crecimiento de *P. aeruginosa* cepa 3C en agar F, y producción del pigmento fluorescente (pioverdina), visualizado en transiluminador.

La producción del pigmento piocianina en algunos casos fue difícil de detectar por sus bajas concentraciones y el encubrimiento por otros pigmentos que sintetiza la misma cepa como piorrubina y/o piomelanina, ante esto se recurrió a la propiedad soluble en cloroformo específico del pigmento piocianina, como se observa en la figura 9B.

#### 9B. Presencia de pigmento piocianina empleando cloroformo



Pigmento piocianina soluble en cloroformo (fondo del tubo), ensayo realizado en cultivos de 24h en caldo BHI. A y B: Presentan pigmento piocianina en cepas de *P. aeruginosa*; C: Ausencia de pigmento piocianina en cepa de *Pseudomonas sp.*

### 3.4 Identificación de cepas *Pseudomonas aeruginosa* con actividad inhibitoria frente a *Helicobacter pylori*

Con la finalidad de identificar aquellas cepas de *P. aeruginosa* que presentan un efecto inhibitorio frente al crecimiento de *H. pylori*, cultivos en fase exponencial fueron sometidos a luz UV para inducir a la producción de piocinas, paralelamente se hizo uso de cultivos sin ser sometidos a luz UV. En ambos casos los cultivos fueron centrifugados y filtrados obteniendo un extracto crudo libre de células.

**Tabla 5. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con efecto inhibitorio frente a *Helicobacter pylori* de los diferentes hábitat**

Cepas <i>H.pylori</i>	Cepas <i>P. aeruginosa</i> con efecto inhibitorio					
	Agua (8 cepas)		Suelo (12 cepas)		Clínico (12 cepas)	
	C-UV	S-UV	C-UV	S-UV	C-UV	S-UV
<b>ATCC 43504</b>	2	0	7	0	0	0
<b>J99</b>	2	0	7	0	0	0
<b>G27</b>	2	0	7	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>9 (28%)</b>					

C-UV: Cultivos con irradiación UV; S-UV: Cultivos sin irradiación UV

Fuente: Cuadro elaborado con datos del anexo 3.

La tabla 5, muestra los resultados obtenidos de las pruebas de inhibición con los extractos crudos de cepas de *P. aeruginosa* sometidos a luz UV, y cultivos no sometidos a luz UV frente a 3 cepas patrón de *H. pylori*: ATCC 43504, J99, G27. De las 32 cepas, solo los extractos crudos de 9 cepas (28%) que fueron irradiados a luz UV presentaron halos de inhibición, estas cepas son de origen ambiental, 2 de 8 cepas procedentes de agua y 7 de 12 cepas procedentes de suelo. Por otro lado los extractos crudos de las 32 cepas sin irradiación a luz UV no presentaron halos de inhibición frente a ninguna cepa de *H. pylori*.

Es importante mencionar que el extracto crudo irradiado con luz UV y el extracto crudo sin irradiación UV de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 no mostró efecto inhibitorio frente a ninguna cepa de *H. pylori*, como se observa en el anexo 3.

**Tabla 6. Diámetro de halos de inhibición (mm) de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sometidas a luz UV (extracto crudo) frente a tres cepas de *Helicobacter pylori*.**

Cepas <i>P.aeruginosa</i> (Extracto crudo)	Halos de inhibición (mm) Cepas <i>H. pylori</i>		
	ATCC 43504	J99	G27
4A	14	10	11
7A	12	11	11
1S	13	12	12
3S	10	10	10
4S	14	12	12
7S	10	10	9
10S	13	11	12
11S	11	9	9
12S	28	25	25

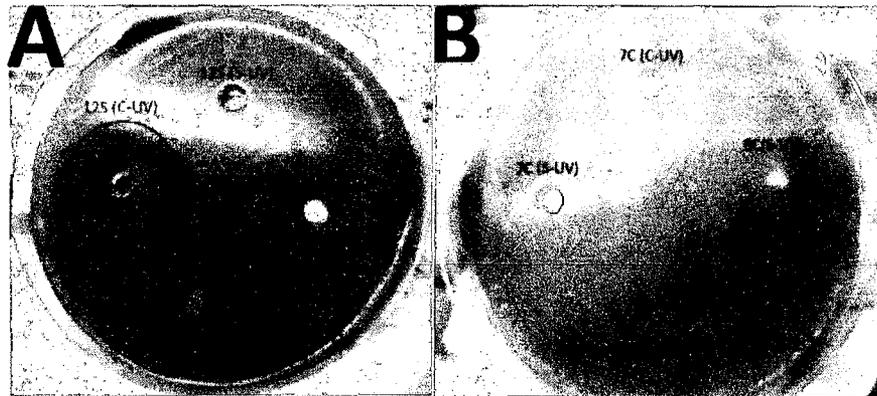
Los datos en la tabla 6, representan la media aritmética de 3 pruebas independientes por cepa de *H. pylori*.

Fuente: Elaboración propia.

La tabla 6, muestra los diámetros de las 9 cepas que inhibieron el crecimiento de *H. pylori* ATCC 43504, J99 y G27, el efecto inhibitorio mostrado en las 3 cepas de *H. pylori* no presentaron una diferencia significativa entre los diámetros de sus halos de inhibición; sin embargo la cepa 12S fue la que presentó mayor halo de inhibición con un diámetro entre 25 a 28 mm dependiendo de la cepa de *H. pylori*, frente a las otras cepas que presentaron halos entre 9 a 14mm.

Los extractos crudos de las 32 cepas de *P. aeruginosa* sometidos a luz UV y no sometidos a luz UV, fueron ensayados por el método difusión radial como se observa en la figura 10.

**Figura 10. Pruebas de inhibición frente a *Helicobacter pylori* ATCC 43504**

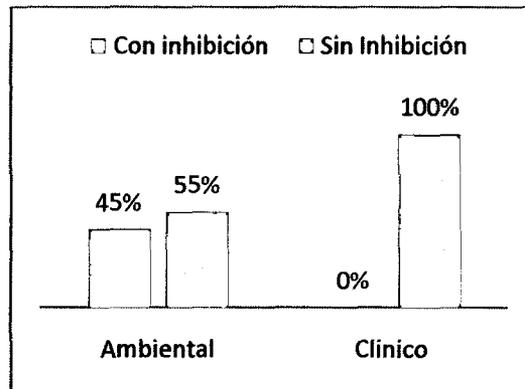


(C-UV): Cultivos sometidos a UV; (S-UV): Cultivos sin irradiación UV. En A: *P. aeruginosa* cepa 12S con halo de inhibición (28mm); En B: No se observa inhibición.

### **3.4.1 Relación entre potencial inhibitorio y procedencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.**

De las 32 cepas, 9 presentaron efecto inhibitorio, las cuales proceden solo de origen ambiental (7 de origen suelo y 2 de origen agua) y ninguna de origen clínico como se ve representado en la figura 11.

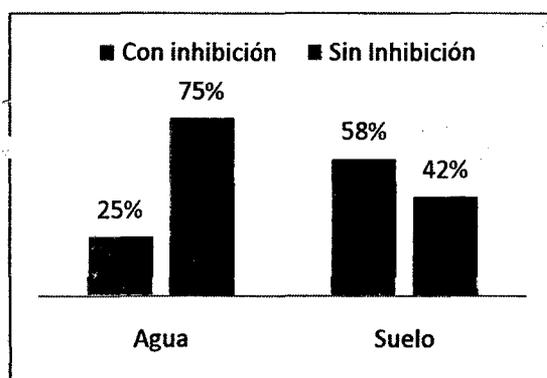
**Figura 11. Porcentaje de inhibición entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen ambiental y clínico**



La figura 11 muestra los porcentajes de inhibición de las 32 cepas de *P. aeruginosa*, observándose que solo hubo inhibición en cepas de origen ambiental (suelo y agua) representado con el 45% (9/20) de cepas con actividad inhibitoria y 55% (11/20) de cepas sin actividad inhibitoria. El 100% (12/12) de cepas de origen clínico no presentan actividad inhibitoria.

El análisis estadístico (anexo 7-A) revela que la distribución de este potencial inhibitorio entre cepas de origen ambiental y clínico no es casual, detectándose una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.012$ ). Es decir que el potencial inhibitorio frente a *H. pylori* es dependiente del origen del que provengan las cepas de *P. aeruginosa*.

**Figura 12. Porcentaje de inhibición entre cepas ambientales de *Pseudomonas aeruginosa***



La figura 12 muestra la distribución dentro de las cepas de origen ambiental (20 cepas) entre agua y suelo. Se obtuvo 25% (2/8) de cepas con actividad inhibitoria de origen agua, en comparación con las cepas de origen suelo donde se observa mayor número de cepas con actividad inhibitoria 58% (7/12). El análisis estadístico (anexo 7-B) no muestra diferencias significativas ( $p=0.197$ ) pudiendo atribuirse la diferencia observada, al azar.

### **3.5 Caracterización para identificación de piocinas en extractos crudos con actividad inhibitoria**

#### **3.5.1 Identificación de tipos de piocinas en pruebas cruzadas entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa***

Se realizaron pruebas cruzadas de inhibición entre las 9 cepas que presentaron efecto inhibitorio frente a *H. pylori* con la finalidad de detectar un efecto antagónico e identificar cepas sensibles a algún tipo de piocina (tipo R ó F y S) mediante tratamiento enzimático (tripsina) como se muestra en la tabla 7, y temperatura a 90°C.

**Tabla 7. Inhibiciones cruzadas entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, con y sin tratamiento enzimático**

		Extracto crudo (SE/E)								
		4A	7A	1S	3S	4S	7S	10S	11S	12S
Cepas Indicadoras	4A		0	0	11	0	9	0	0	0
	7A	0		0	11	0	9	0	0	0
	1S	0	0		0	0	9	0	0	0
	3S	0	0	0		0	9	0	0	0
	4S	9	11	9	9		9	9	9	0
	7S	0	0	0	11	0		0	0	0
	10S	0	0	0	11	11	9		10	0
	11S	0	0	0	0	0	9	0		0
	12S	9	0	9	11	0	9	9	9	

(SE/E) Sin tratamiento / tratamiento a tripsina

Fuente: Elaboración propia.

La tabla 7, muestra los resultados obtenidos en las pruebas cruzadas de inhibición entre las 9 cepas de *P. aeruginosa* y los extractos crudos de las mismas cepas, en donde se observa que los extractos crudos sin tratamiento enzimático con tripsina (SE) de las cepas 4A, 7A, 1S, 4S, 10S y 11S mostraron inhibición al menos frente a una cepa, la cual se perdió después del tratamiento enzimático (E).

El extracto crudo de la cepa 7S mostró inhibición frente a todas las cepas, el cual se conservó después del tratamiento enzimático.

El extracto crudo de la cepa 3S mostró inhibición frente a 6 cepas, pero tras el tratamiento enzimático perdió su efecto frente a 2 cepas (7A y 10S), lo que significaría la presencia que dos tipos de pirocina producida por la cepa 3S.

Ningún extracto crudo mostró actividad después del tratamiento a 90°C.

### 3.5.2 Identificación de tipos de piocinas en pruebas frente a *Helicobacter pylori*

#### 3.5.2.1 Tratamiento Enzimático

El tratamiento enzimático (tripsina 2mg/ml) de los extractos crudos con efecto inhibitorio frente a *H. pylori* se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8. Diámetro de halos de inhibición de extractos crudos con tratamiento enzimático frente a *Helicobacter pylori* ATCC 43504**

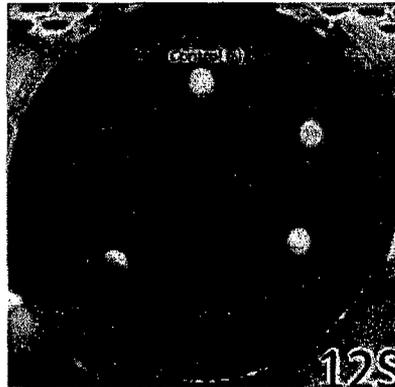
Cepa <i>P.aeruginosa</i> (Extracto crudos)	Control (sin tratamiento) (mm)	Tratamiento con Tripsina (mm)
1 <sup>a</sup>	15	13
7 <sup>a</sup>	13	11
1S	13	13
3S	10	10
4S	14	14
7S	9	7
10S	13	13
11S	9	8
12S	28	29

Los datos en la tabla 8, son la media de 3 pruebas independientes.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 8 y figura 13, se observa que los extractos crudos de las 9 cepas de *P. aeruginosa* no perdieron su efecto inhibitorio tras el tratamiento enzimático, mostrando halos de inhibición similares a los halos de inhibición control (sin tratamiento enzimático). Estadísticamente (anexo 7-C) no existe una diferencia significativa ( $p=0.98$ ), por lo cual la enzima no tiene ningún efecto en la inhibición del extracto crudo.

**Figura 13. Caracterización enzimática con el extracto crudo de la Cepa 12S frente a *H. pylori* ATCC 43504.**



Tripsina: Inhibición con el extracto crudo después del tratamiento enzimático.  
 Control (+): Extracto crudo de la misma cepa sin tratamiento enzimático.  
 Control (-): Caldo BHI

### 3.5.2.2 Tratamiento a diferentes temperaturas

La Termotolerancia de los extractos crudos con efecto inhibitorio a diferentes temperaturas (60, 90, 120°C) se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9. Diámetro de halos de inhibición de extractos crudos con tratamiento a diferentes temperaturas frente a *H. pylori* ATCC 43504**

Cepa <i>P. aeruginosa</i> (Extractos crudos)	Control (sin tratamiento) (mm)	Temp. 60°C (mm)	Temp. 90°C (mm)	Temp 120°C (mm)
1A	15	14	15	14
7A	13	13	13	12
1S	13	13	13	13
3S	10	9	10	11
4S	14	14	14	13
7S	9	8	8	8
10S	13	12	13	13
11S	9	9	9	9
12S	28	28	28	27

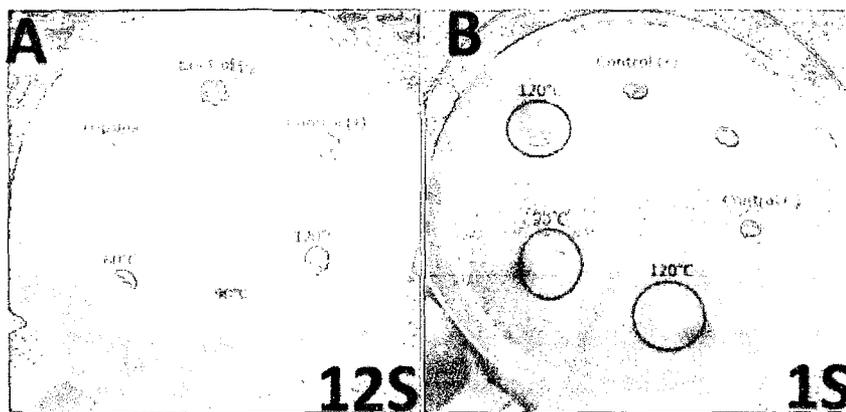
Los datos en la tabla 9, representan la media aritmética a partir de 3 pruebas independientes. Fuente: Elaboración propia

Se puede observar que no hubo cambios significativos en los diámetros de los halos de inhibición de los extractos crudos de las cepas de *P. aeruginosa* después del tratamiento a diferentes temperaturas, y estadísticamente (anexo 7-D) tampoco existe una diferencia significativa ( $p=0.87$ ) entre el halo de inhibición control de las cepas de *P. aeruginosa* y los halos de inhibición obtenidos tras el ensayo a distintas temperaturas, por lo cual no existe un

efecto de la temperatura sobre el extracto crudo de las cepas que inhiben *H. pylori*.

La figura 14 muestra el ensayo de dos cepas tras ser sometidas a las pruebas de termotolerancia, visualizándose en todos los casos un tamaño similar al del extracto crudo control, observándose que la temperatura no altera el efecto inhibitorio que poseen las cepas de *P. aeruginosa* en el crecimiento de *H. pylori*.

**Figura 14. Caracterización térmica frente a *Helicobacter pylori* ATCC 43504**

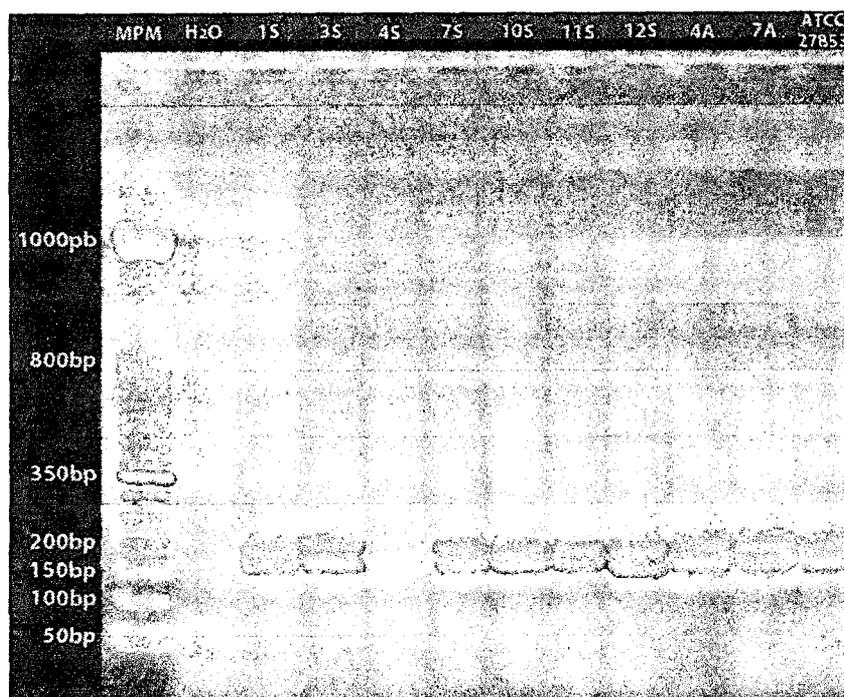


En A y B se muestra las cepas 12S y 1S respectivamente presentando halos de inhibición posterior al tratamiento.

### **3.6 Identificación molecular de genes de piocina R en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con actividad inhibitoria frente a *Helicobacter pylori***

Se utilizó primer PA0617 que codifica la placa basal en la estructura de piocina R y genera un amplicón de 204pb y primer PA0628 que codifica las fibras de la cola y genera un amplicón de 162pb.

**Figura 15. Amplificación por PCR múltiple del gen piocina R en *Pseudomonas aeruginosa***



PM: Marcador de peso molecular (50pb DNA Ladder). H<sub>2</sub>O: Control negativo. Los amplicones se detectaron en gel agarosa al 1.6%, teñido con RedGel 3X y visualizado en trasiluminador UV.

En la figura 15, se observa la corrida electroforética de las 9 cepas con actividad inhibitoria incluido ATCC 27853, solo la cepa 4S no presentó amplificación para ningún primer.

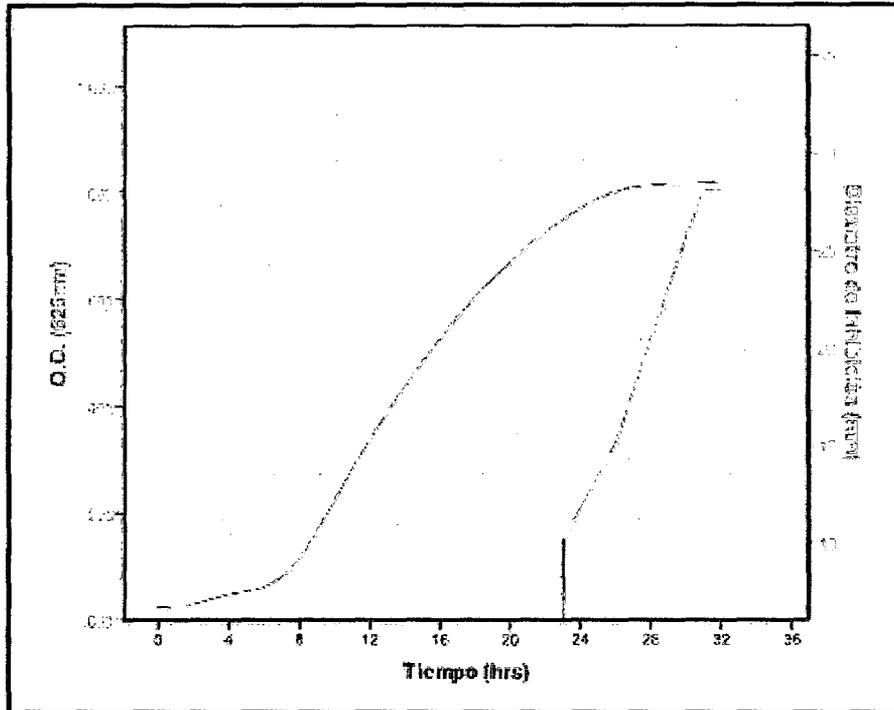
Con ambos primers se determinó la presencia de genes codificantes para piocina tipo R en las 32 cepas de *P. aeruginosa*, donde el 94% (30/32) de cepas presentaron genes para la piocina tipo R, y 6% (2/32) de cepas no presentaron genes de este tipo, siendo estas específicamente de origen suelo (anexo 3, 4).

### **3.7 Cinética de crecimiento y actividad inhibitoria de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 12S**

Siendo la cepa *P. aeruginosa* 12S con mayor efecto inhibitorio frente a 3 cepas *H. pylori*: ATCC 43504, J99 y G27; se realizó la curva de crecimiento sin inducción (UV) durante 32h en caldo de cultivo BHI e incubación a 37°C, se

tomaron muestras a lo largo del tiempo total para realizar lecturas de densidad óptica (O.D.) y pruebas de inhibición.

**Figura 16. Cinética de crecimiento y actividad inhibitoria de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 12S**



Crecimiento bacteriano de la cepa 12S (azul) versus curva de producción del agente antimicrobiano (verde). Las lecturas se realizaron a: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 23, 26, 29 y 32h

Fuente: Gráfico elaborado con datos del anexo 5

La figura 16, muestra el crecimiento bacteriano de la cepa 12S, a partir de las 6h comenzó la fase exponencial y una fase estacionaria a partir de las 24h.

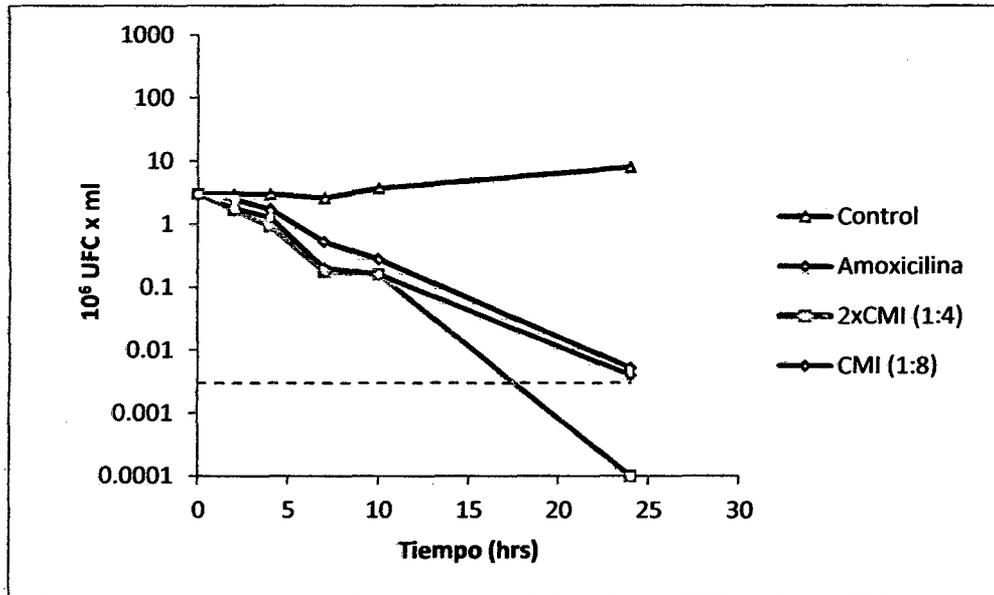
La actividad inhibitoria frente a *H. pylori* ATCC 43504 se presentó a partir de las 23h de crecimiento bacteriano (10mm) y alcanzó mayor inhibición a las 31h (28mm).

### 3.8 Cinética de muerte de *Helicobacter pylori* ATCC 43504

Se realizó la cinética de muerte para identificar el poder bactericida del extracto crudo de *P. aeruginosa* cepa 12S y determinar la concentración mínima bactericida (CMB), para lo cual fue imprescindible obtener el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) el cual se observó en la dilución 1:8.

La figura 17 muestra el comportamiento de *H. pylori* en 24h de incubación a 37°C en condiciones microaerofílicas.

**Figura 17. Cinética de muerte de *Helicobacter pylori* ATCC 43504**



Efecto de CMI (1:8), 2xCMI (1:4) del extracto crudo de la cepa 12S, y amoxicilina (0.12ug/ml); en el desarrollo de *H. pylori* ATCC 43504. Los recuentos se realizaron a: 0, 2, 4, 7, 10 y 24 h.

(-----): Indica la reducción del 99.9% de las bacterias ( $3\log_{10}$ )

Fuente: Gráfico elaborado con datos del anexo 6.

El recuento inicial (tiempo 0) de *H. pylori* fue  $3 \times 10^6$  ufc, a partir del cual se evaluó la reducción de  $3\log_{10}$ .

A las 24h de incubación, amoxicilina (0.12µg/ml) reportó un recuento de  $5.2 \times 10^3$ .

CMI (dilución 1:8) reportó un recuento de  $4 \times 10^3$  a las 22h, mientras que 2xCMI (dilución 1:8) mostró esta reducción de  $3\log_{10}$  a las 18h de incubación.

## DISCUSION

Esta investigación está dirigida a demostrar la acción inhibitoria producida por *Pseudomonas aeruginosa* por acción de piocinas producidas frente a *Helicobacter pylori*.

A partir de 32 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de 3 hábitat diferentes (agua, suelo y clínico) se logró identificar 9 cepas con acción inhibitoria frente a *H. pylori*; lo cual se evidenció solo mediante la exposición previa de los cultivos a un agente mutagénico (luz UV) (tabla 5), manifestando el posible rol de piocinas como causante total o parcial de este efecto. Sin embargo podrían estar incluidos también otros compuestos producidos en su metabolismo como: pigmentos con propiedades antibióticas y moléculas extracelulares que participan en el sistema Quorum Sensing.

Según el origen de las cepas, las pruebas de susceptibilidad antibiótica en *P. aeruginosa* muestran diferencias notables en los tres hábitat (tabla 4), las cepas de origen clínico (muestras de pacientes con quemaduras y catéteres intravascular y vesicales) presentan en general mayor resistencia antibiótica, característico de poblaciones bacterianas intrahospitalarias las cuales están sometidas a terapias antibióticas constantes. Las cepas de agua (muestras de agua con presencia de metales pesados) presentan también resistencia antibiótica debido a su relación con el desarrollo de resistencia a metales (Barkey y col. 1986). Las cepas de suelo obtenidas en este estudio no presentaron resistencia a ningún antibiótico, debido a que estas poblaciones no están bajo presión selectiva antibiótica, como lo menciona Ruiz L. (2007).

La producción de pigmentos es una característica fenotípica y *P. aeruginosa* se caracteriza por sintetizar una fenazina en particular, piocianina, y el medio de cultivo Agar P (King A) es el recomendado para la producción de pigmentos fenazínicos (King y col. 1954). Las 32 cepas evaluadas en este estudio mostraron presencia de este pigmento, sin embargo bajas cantidades de piocianina pueden no ser evidenciadas en agar P, esto no descarta que el microorganismo no la sintetice, pero ante la sospecha de su presencia se recurre a su característica soluble en cloroformo (Ledermann W. 2007), prueba

que también confirmó nuestros resultados. Reszka K. y col. (2004) determinan que la piocianina posee características antibióticas. La pioverdina, otro pigmento que está presente en esta especie, comparte esta misma característica antibiótica, según George C y col. (1995); Merriman T y col. (1995), la porción proteica del pigmento pioverdina posee una estructura cíclica similar al de las proteínas con actividad antibiótica que poseen las bacterias gram positivas. En este estudio ambos pigmentos no pueden ser atribuidos como responsables de la actividad frente a *H. pylori*, ya que el efecto inhibitorio no muestra ser dependiente de la presencia de uno o ambos pigmentos en las cepas identificadas con estas características, es decir no todas las cepas de *P. aeruginosa* que presentaron inhibición frente a *H. pylori* mostraron síntesis de ambos pigmentos simultáneamente.

La caracterización de los extractos crudos se realizó por pruebas enzimáticas con tripsina, termotolerancia y determinación de genes que codifican piocinas por PCR, para determinar si el agente causal del efecto inhibitorio de las 9 cepas de *P. aeruginosa* frente a *H. pylori* ya identificadas recaía sobre las piocinas, lo cual se detalla a continuación:

Mediante las pruebas de inhibición cruzada entre cepas de *P. aeruginosa* (tabla 7) se ve resaltado el comportamiento de 2 cepas en particular 7S y 4S, dicho comportamiento respondió a lo reportado por Ishii S. y col. (1965) (Tratamiento enzimático con tripsina) y Sano y col. (1981) (Termotolerancia). El extracto crudo de la cepa 7S presentó piocina tipo R por haber mostrado inhibición activa después del tratamiento enzimático con tripsina (tabla 7), presenta genes codificantes mediante PCR para piocina tipo R (figura 15) y perder actividad cuando fue sometido a temperaturas superiores a 70°C. En cambio el extracto crudo de la cepa 4S presento piocina tipo S por la pérdida de actividad inhibitoria tras el tratamiento enzimático con tripsina (tabla 7), temperaturas superiores a 70°C y ausencia de genes codificantes para piocina tipo R (figura 15).

La identificación de piocinas por pruebas frente a *H. pylori* mediante el tratamiento enzimático (tabla 8) mostraron presencia de resistencia a tripsina

en el total de los extractos crudos, lo cual concuerda con Ishii S. y col (1965) como una característica de piocinas para tipo R ó F la cual no es compartida por la piocina tipo S. Cabe resaltar que el extracto crudo de la cepa 4S no mostró presencia de genes codificantes de piocina R, por lo cual si la inhibición fuese por una piocina S esta hubiera sido inactivada bajo este tratamiento, además que el espectro de inhibición de las piocinas S se limita frente a cepas de la misma especie como indica Michell-Briand Y. y col. (2002).

En los tratamientos a diferentes temperaturas a los que fueron sometidos los extractos crudos, a temperatura de 60°C no mostraron pérdida en su efecto lo cual concuerda con el comportamiento de piocinas, los resultados a temperaturas superiores (90°C y 120°C) tampoco mostraron pérdida de su actividad (tabla 9). Higerd y col. (1967), Sano y col. (1981) reportan como una propiedad de las piocinas la pérdida de la actividad bactericida a temperaturas superiores a 70°C, por esta razón la inhibición de *H. pylori* por los extractos crudos de las cepas de *P. aeruginosa* no es atribuida a la acción de piocinas.

La determinación molecular para piocina tipo R utilizando primers específicos (figura 15), mostró presencia de genes codificantes para este tipo de piocina en 8 de las 9 cepas con efecto inhibitorio. Si bien estas cepas tienen la capacidad de producir piocina tipo R, esta no es la causante de su acción inhibitoria ya que a temperaturas mayores a 70°C los extractos crudos no fueron inactivados. La presencia de genes codificantes para piocinas R en las 32 cepas empleadas por este estudio fue del 94% (30/32), lo que concuerda con la producción de piocina R en mas del 90% de cepas de *P. aeruginosa* establecido por Smith A. y col. (1992) mediante el método de Piocinotipia (tipificación de piocinas). Las cepas clínicas mostraron genes codificantes para la piocina R en un 100%, Köhler T. y col. (2010) reportan un 77% (47/61) de cepas clínicas con presencia de estos genes utilizando los mismos primers; esta diferencia podría deberse al origen de las muestras, ya que este estudio utilizó aislados provenientes de muestras de catéteres intravasculares y vesicales en pacientes con quemaduras, a diferencia de las muestras provenientes de aspirados traqueales empleados por el autor.

Cabe resaltar que la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 presentó genes codificantes de piocina R (figura 15), dato que no fue anteriormente reportado. La cepa ATCC 27853 no mostró algún efecto inhibitorio en los cultivos con radiación y sin radiación UV frente a las 3 cepas de *H. pylori* ensayadas, lo cual difiere con los resultados obtenidos por Krausse y col. (2005) quienes reportan acción inhibitoria de esta cepa frente al 94% de cepas *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas. Esto podría ser por la diferencia de métodos empleados para la inhibición, como por las características particulares de cada cepa a inhibir, ya que este estudio usó cepas de *H. pylori* que este autor no empleó.

Ante estos hechos aún sigue estando presente las características de actividad inhibitoria por la cepa 12S de *P. aeruginosa* que frente a las 3 cepas de *H. pylori* mostró halos de inhibición mayores (28mm) en comparación con las demás cepas del estudio. El extracto crudo de esta cepa no mostró inactivación con tripsina (tabla 8) y fue termotolerante a 120°C (tabla 9), lo que indica que el compuesto inhibidor no posee naturaleza proteica.

La curva de crecimiento realizada con la cepa 12S (figura 16), mostró actividad inhibitoria a finales de la fase exponencial/inicios de la fase estacionaria; Lacey S. y col. (1995) identifican a la 4 hidroxí-2 heptilquinolona (HHQ) como probable compuesto con actividad frente a *H. pylori*; el modo de acción de este compuesto en *H. pylori* no es conocido y podría actuar sobre un lugar en la cadena de transporte de electrones. HHQ es precursora de una molécula señal secundaria única en *P. aeruginosa* (PQS) la cual regula la expresión genética en respuesta a la densidad poblacional (Quorum Sensing), y se presenta en niveles altos en fase estacionaria como lo establece Lepine F. y col. (2003). Por ende la actividad inhibitoria que se observa en este estudio podría deberse a la 4 hidroxí-2 heptilquinolona.

La cinética de crecimiento (figura 16) muestra un halo de 28mm en 32h, este mismo halo se obtuvo con el cultivo tratado (UV), a las 8 - 9h. La irradiación con luz UV va generar acción letal como también efecto inductor de piocinas; en ambos casos conlleva a lisis celular y liberación de sus productos intracelulares en periodos de tiempo más cortos, esta misma interpretación es

atribuida en los resultados obtenidos por Krausse y col. (2005). Si bien el método empleado en el presente estudio difiere del empleado por este autor (cloroformo) la consecuencia final fue la misma, lisis celular.

A partir de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó la cinética de muerte de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 para determinar la acción bactericida del extracto crudo de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 12S (figura 17), donde se evaluaron las diluciones correspondientes a CMI (dilución 1:8) y 2xCMI (dilución 1:4), la CMI no mostró una reducción menor a  $3\log_{10}$  dentro del tiempo evaluado, mientras que la 2xCMI mostró una reducción de  $3\log_{10}$  dentro de las 18h, siendo esta la concentración mínima bactericida (CMB). La amoxicilina (0.12ug/ml) no mostró efecto bactericida dentro del tiempo evaluado, estos resultados manifiestan que la cepa 12S tiene la capacidad de matar a *H. pylori* con mayor eficiencia que amoxicilina.

Como punto final se observó una marcada diferencia en el potencial inhibitorio que presentaron las cepas de *P. aeruginosa*, la cual es dependiente del hábitat del que provienen. Lacey S. y col. (1995) obtiene 50% (5/10) de cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico con actividad inhibitoria frente a *H. pylori*, y esta investigación no reporta ninguna cepa del mismo origen (clínico) con esta acción, lo cual causa sorpresa. Se resalta la actividad inhibitoria frente a *H. pylori* con cepas de *P. aeruginosa* de origen ambiental debido a que la mayoría de investigaciones centra su estudio en cepas de origen clínico.

## CONCLUSIONES

1. En el 20% (12/60) de muestras de suelos provenientes de cultivos agrícolas localizados en los márgenes rivereños del río Huatanay de la ciudad del Cusco se aisló *Pseudomonas aeruginosa*.
2. 9 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen ambiental (7 cepas de origen suelo y 2 cepas de origen agua) presentaron actividad inhibitoria frente a 3 cepas *Helicobacter pylori* ATCC 43504, J99 y G27, empleando el método de inhibición por difusión radial.
3. Las pruebas realizadas a diferentes temperaturas muestran que el compuesto responsable de la inhibición posee termoresistencia a 120°C y bajo tratamiento enzimático usando tripsina (2mg/ml) no muestra pérdida de actividad inhibitoria, por lo cual el compuesto responsable posee características no proteicas.
4. En la identificación de piocinas tipo R, por la técnica de PCR múltiple empleando los primers PAO617 y PAO628, se obtuvo que 94% de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* poseen genes codificantes para piocina R.
5. Las bacteriocinas (piocinas) producidas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen agua, suelo y clínico, no son responsables de la actividad inhibitoria frente a 3 cepas patrón de *Helicobacter pylori*: ATCC 43504, J99 y G27.
6. La curva de muerte de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 empleando el extracto crudo a doble concentración de la CMI (2xCMI) de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 12S, muestra una reducción del 99.9% de células viables de *H. pylori* dentro de un periodo de 18h, por lo cual el extracto crudo posee actividad bactericida.

## SUGERENCIAS

- Continuar con el estudio de nuevos agentes antimicrobianos como alternativa ante el incremento de resistencia a los antimicrobianos clásicos para la erradicación de *Helicobacter pylori*.
- Emplear técnicas de cromatografía para determinar la sustancia con efecto inhibitor que presenta *Pseudomonas aeruginosa* frente *Helicobacter pylori*

## BIBLIOGRAFIA

Ahmed N. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*. Is the debate over?. *Ann Clin Microbiol Antimicrobials*. 2005; 4: 17

Alarcón, T., Baquero M., Domingo D., Lopez-Brea M. y Rojo G. Diagnostico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2a Ed. SEIMC. España. Eds.: Emilia Cercenado y Rafael Canton. 2004; cap. 17.

Barkey S. En: Dueñas C. y Quispe F. Resistencia a Metales pesados y antibióticos, de *Pseudomonas spp.* aislados de los ríos Salado y Cañipia - Espinar – Cusco. Cusco. Peru. 2010.

Blaser M. J. and Atherton J. C. *Helicobacter pylori* persistent: biology and disease. *J Clin Invest*. 2004; 113: 321-33.

Braun V., Pils H. and Grob P. Colicins: structures, modes of actions, transfer through membranes, and evolution. *Arch. Microbiol*. 1994; 161:199–206.

Chang P. C. and Blackwood A.C. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Stanley, G. M. Garrity (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York; 2005; 2:327.

Chey W. D. and Wong BCY. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol*. 2007; 102: 1808-25.

Cisneros S. Mecanismos de Resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol. Bogotá, Colombia. 2009.

Cotter P. D., Hill C. and Ross R. P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews of Microbiology*. 2005; 3:777-788.

Del Castillo T. Analisis genómico, transcripcional y de flujo del metabolismo de la glucosa en *Pseudomonas putida* KT2440. Granada, España. 2008.

Deprez, P. H., Ghosh P., Goodlad, R. A., Lacey, S. L., Millership, S. and Playford, R. J. Hypergastrinaemia: a new mechanism. *Lancet*. 1991; 338, 410-1.

Déziel E., Lepine F., Milot S., He J., Mindrinos M., Tompkins R. and Rahme L. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *PNAS*. 2003; 101(5):1339–1344.

Duan K., Lafontaine E. R., Majumdar S. and Sokol P.A. RegA, iron, and growth phase regulate expression of the *Pseudomonas aeruginosa* *tol-oprL* gene cluster, *J. Bacteriol*. 2000; 182:2077–2087.

Dueñas C. y Quispe F. Resistencia a Metales pesados y antibióticos, de *Pseudomonas spp.* aislados de los ríos Salado y Cañipia - Espinar – Cusco. Cusco. Peru. 2010.

Enfedaque J., Ferrar S., Guasch J.F., Tomas J. and Regue M. Bacteriocin 28b from *Serratia marcescens* N28b: identification of *Escherichia coli* surface components involved in bacteriocin binding and translocation. *Can. J. Microbiol*. 1996; 42:19–26.

Everhart J., Kruszon D., Perez G., Sue T. and Maquillan G. Seroprevalence and Ethnic Differences in *Helicobacter pylori* Infection among Adults in the United States. *JID*. 2000; 181:1359-63.

Flamm R., Beyer J., Tanaka S. y Clement J. Kill kinetics of antimicrobial agents against *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996; 38:719-725.

Forné M. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* y tratamiento de la infección en pacientes con ulcera duodenal. Barcelona. España. 2001.

Fulthorpe R., Rhodes A. and Tiedje J. Pristine soils mineralize 3-Chlorobenzoate and 2,4-Dichlorophenoxyacetate via Different Microbial Populations. *Appl. and Env. Micro.* 1996; 62(4):1159-1166.

Fuqua C., Parsek, M. R. and Greenberg, E. P. Regulation of gene expression by cell to cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 2001; 35, 439–468.

Fuqua C., Winans S. and Greenberg P. Quorum sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *Journal of Bacteriol.* 1994; 2:2969-275.

Gamboa J. Infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcerosa péptica. Hospital General Docente “Vladimir Ilich Lenin”, Holguín – Cuba UNIV DIAG. 2003; 3(1):20-4.

García A. Experimentos en Microbiología de suelo. Mexico. 1981; p. 44.

García A., Henríquez P., Retamal C., Pineda S., Delgado C. y González C. Propiedades probióticas de *Lactobacillus spp.* aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Méd Chile.* 2009; 137: 369-376.

Garrity G., Bell J. and Lilburn T. Taxonomic Outline of the Prokaryotes - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - 2nd. ed. Release 5.0. 2004.

Gecele G. Determinación y evaluación de la actividad de cepas de *Lactobacillus* de origen humano sobre *Helicobacter pylori*. Concepcion. Chile. 2010.

Georges, C. and Meyer J.M. High-molecular-mass, iron-repressed cytoplasmic proteins in fluorescent *Pseudomonas* - potential peptidesynthetases for pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995; 132: 9–15.

Gordon D. M., Oliver E. and Littlefield-Wyer J. In: Bacteriocins Ecology and Evolution. Riley M. A., Chavan M. A. 2007; cap. 2, p.5-6.

Govan J.R. In vivo significance of bacteriocins and bacteriocin receptors, *Scand. J. Infect. Dis.* 1986; 49:31–37.

Graham D.Y. and Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nature Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2008; 5: 321-31.

Green S., Schroth M., Cho J., Kominos S. and Vitanza-Jack V. Agricultural plants and soil as a Reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Micro.* 1974; 28(6):987-991.

Hardalo C. and Edberg S. C. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Critical reviews in microbiology.* 1997; 23:47-75.

Hegarty J. P., Dowd M. T. and Baker K.H. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States, *J. Appl. Microbiol.*, 1999; 87, 697.

Hertveldt K. and Lavigne R. Bacteriophages in *Pseudomonas*. In: Rehm B. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory.* New Zealand: Wiley-VCH. 2008; cap.10 p. 255-291.

Higerd T., Baechler C., and Berk S. In Vitro and in vivo Characterization of Pyocin, *Journal OF Bacteriology.* 1967; 1976-1986.

Ishii S. I., Nishi Y. and Egami F. The fine structure of a pyocin, *J. Mol. Biol.* 1965; 13:428–431.

Jack R.W., Tagg J.R. and Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 1995; 59:171–200.

Kim Y. S. and Kim E.J. A plasmid responsible for malonate assimilation in *Pseudomonas fluorescens*. *Plasmid.* 1994; 32: 219–221.

King E. y Ward W. and Raney D. In: D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Stanley, G. M. Garrity (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York. 2005; 2:345.

Kiratisin P., Tucker K.D. and Passador L. LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. J. Bacteriol. 2002; 184:4912-4919.

Klaenhammer T. R. Bacteriocins of acid lactic bacteria. Biochimie, 1988; 70(3):337-349.

Köhler T., Donner V. and Van Delden C. Lipopolysaccharide as Shield and Recertor for R-Pyocin-Mediated Killing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2010; 192:1921-1928.

Krause R., Piening K. and Ullmann U. Inhibitory effects of various microorganisms on the growth of *Helicobacter pylori*. Letters in Applied Microbiology. 2005; 40:81-86.

Kuroda K. and Kageyama M. Comparative study of F-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*, J. Biochem. 1981; 89:1721-1736.

Lacey S., Mehmet S. and Taylor G. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by 4-hydroxy-2-alkyl-quinolines produced by *Pseudomonas aeruginosa* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1995; 36:827-831.

Lau P., Parsons M. and Uchimura T. Molecular evolution of E colicin plasmids with emphasis on the endonuclease types. See Ref. 1992; 41, 65:353-78.

Lepine F., Déziel E., Milot S. and Rahme L. G. A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. Biochim. Biophys. 2003; 1622, 36-40.

Levin J. C. and Stein D. C. Cloning, complementation, and characterization of an *rfaE* homolog from *Neisseria gonorrhoeae*, J. Bacteriol. 1996; 178:4571-4575.

Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión – Ministerio de Salud del Perú 2002.

Matsui H., Sano Y., Ishihara H. and Shinomiya T. Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (*prtN*) and negative (*prtR*) regulatory genes, J. Bacteriol. 1993; 175:1257–1263.

May T.B., Hinabarger D., Maharaj R., Kato J., Chu L., DeVault J.D., Roychoudhury S., Zielinski N.A., Berry A. and Rothmel R.K. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: A key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin. Microbiol. 1991; 4:191-206.

Mazuriers S., Van de Giessen A., Heuvelman K. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. Lett. Appl. Microbiol. 1999; 14:260-272.

Megraud F. and Corti R. Resistencia bacteriana del *Helicobacter pylori* en el mundo en el año 2009. Acta Gastroenterol Latinoam 2009; 39:282-290.

Menz G. L. and Hazell S. L. Evidence for a pentose phosphate pathway in *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol. Lett. 1991; 84:331–336.

Menz G. L., Hazell S. L., and Burns B. P. Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. J. Gen. Microbiol. 1993; 139:3023–3028.

Merriman, T. R., Merriman M.E. and Lamont I.L. Nucleotide-sequence of *pvdD*, a pyoverdine biosynthetic gene from *Pseudomonas aeruginosa* - *pvdD* has similarity to peptide synthetases. J. Bacteriol. 1995; 177:252–258.

Meyer J. M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species, Arch. Microbiol. 2000; 174:135–142.

Meyer, J. M., Azelvandre P. and Georges C. Iron metabolism in *Pseudomonas*: Salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Biofactors. 1992; 4:23–27.

Michell-Briand Y. and Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie. 2002; 84:499-510.

Moreno F., Gonzalez-Pastor J.E., Baquero M.R. and Bravo D. The regulation of microcin B, C and J operons. *Biochimie*. 2002; 84:521–529.

Mota-Meira M., Lapointe G., Lacroix C, and Lavoie M. C. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000; 44:24-29.

Nakayama K., Takashima K., Ishihara H., Shinomiya T., Kageyama M., Kanaya S., Ohnishi M., Murata T., Mori H. and T. Hayashi. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage, *Mol. Microbiol*. 2000; 38:213–231.

Ojeda K. Colonización bacteriana y resistencia a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislados de pacientes de la unidad de quemados del Hospital Regional Cusco. Cusco. Peru. 2011.

Olsthoorn, R.C., Garde G., Dayhuff T., Atkins J. F. and Van Duin J. Nucleotide-sequence of a single-stranded RNA phage from *Pseudomonas aeruginosa* - kinship to coliphages and conservation of regulatory RNA structures. *Virology*. 1995; 206:611–625.

Palleroni N. J. Present situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads. In: E. Gili, S. Silver, and B. Witholt (Eds.) *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. ASM Press. 1992; 105-115.

Parret, R. and De Mot. Novel bacteriocins with predicted tRNase and pore-forming activities in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Mol. Microbiol*. 2000; 35:472–473.

Parsonnet J., Shmueli H. and Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults, *JAMA*. 1999; 282, 2240.

Pearson J.P., Van Delden C. and Iglewski B.H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol*. 1999; 181:1203-1210.

Piñol F. y Paniagua M. *Helicobacter pylori* y lesiones endoscópicas e histológicas en mucosa gástrica de pacientes de 50 años y más. Instituto de Gastroenterología. La Habana, Cuba. 1999.

Pugsley A. and Oudega B. Methods for studying colicins and their plasmids. In: Plasmids, a Practical Approach, ed. KG Hardy. 1987; p. 105–61.

Quispe F., y Condori E. Evaluación antimicrobiana in-vitro de sangre de grado (*Croton lechleri*) frente a *Helicobacter pylori* obtenidas de biopsias de pacientes del Hospital Regional del Cusco, Perú. 2009.

Raloff J. Staging germ warfare in foods. *Sci. News*. 1998; 153:89–90.

Ramírez A, Gilman R.H. and Watanabe J. Epidemiología de la infección por el *Helicobacter pylori* en el Perú: Niveles socioeconómicos bajo, medio y alto 2002. 2002.

Ramírez A., Chinga E. y Mendoza D. Variación de la prevalencia del *Helicobacter pylori* y su relación con los niveles de cloro en el agua de la Atarjea, Lima, Perú. Periodo 1995-2002. *Rev. Gastroenterol.* 2004; 24:223-229.

Ramírez A., Gilman R. H. and Watanabe J. The Gastrointestinal Physiology Working Group: Ecology of *Helicobacter pylori* in Peru: Infection rates in coastal, high altitude and jungle communities. 1992; 33: 604-605.

Reszka, K. J., O'Malley Y., McCormick M. L., Denning G. M. and Britigan B. E. Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 36(11): 1448.

Richards M. J., Edwards J. R., Culver D. H., and Gaynes R. P. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med.* 1999; 27:887-892.

Riley M. A. and Wertz J. E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002; 56:117.

Riley M. A., Chavan M. A. Bacteriocins Ecology and Evolution. 2007; cap. 3. p. 20.

Ruiz L. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportaciones al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos, Barcelona, España. 2007

Sano Y. and Kageyama M. Purification and properties of an S-type pyocin, pyocin AP41, *J. Bacteriol.* 1981; 146:733–739.

Sano Y., Kobayashi M. and Kageyama M. Functional domains of S-type pyocins deduced from chimeric molecules. *J. Bacteriol.* 1993; 175:6179-8615.

Sano Y., Matsui H., Kobayashi M. and Kageyama M. Pyocins S1 and S2, bacteriocins of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*, ed. S Silver. 1990; 352-358.

Sano Y., Matsui H., Kobayashi M. and Kageyama M. Molecular structures and functions of pyocins S1 and S2 in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 1993; 175:2907–2916.

Schalk I. J., Hennard C., Dugave C., Poole K., Abdallah M.A. and Pattus F. Iron-free pyoverdinin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport, *Mol. Microbiol.* 2001; 39:351–360.

Seo Y. and Galloway D.R. Purification of the pyocin S2 complex from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: analysis of DNase activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 172:455–461.

Sgouras D., Maragkoudakis P., Petraki K., Martinez-Gonzalez B., Eriotou E., Michopoulos S., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. and Mentis A. In vitro and

in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(1):518-526.

Smith A. W., Hirst P. H., Hughes K., Gensberg K. and Govan J. R. The pyocin Sa receptor of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with ferripyoverdin uptake, *J. Bacteriol.* 1992; 174:4847-4849.

Strauch E., Kaspar H., Schaudinn C., Damasko C., Konietzny A., Dersch P. and Skurnik M. Analysis of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 529:249-251.

Thomsen L., Gavin L. and Tamsan-Jones J. B. Relation of *Helicobacter pylori* to the human gastric mucosa in chronic gastritis of the antrum. *Gut.* 1990; 31:1230-6.

Torreblanca M., Meseguer I. and Ventosa A. Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett. Appl. Microbiol.* 1994; 19: 201-5

Torres A., Aznar R., Gatell J., Jimenez P., Gonzales J., Ferrer A., Celis R. and Rodriguez-Roisin R. Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 142:523-528.

Uratani Y. and Hoshino T. Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential, *J. Bacteriol.* 1984; 157:632-636.

Wang J.T. Direct DNA amplification and restriction pattern analysis of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer and their families, *J. Infect. Dis.* 1993; 168, 1544.

Whiteley M., Lee K. M. and Greenberg, E. P. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 13904-18909.

## Fuentes electrónicas

[http://www.cmp.org.pe/documentos/librosLibres/tsmi/Cap12\\_Helicobacter\\_pylori.pdf](http://www.cmp.org.pe/documentos/librosLibres/tsmi/Cap12_Helicobacter_pylori.pdf)

## Libros

Centro Latinoamericano *Helicobacter pylori* (CLAHP) 2007. Concepción. Chile.

Kirsop B. and Doyle A. 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells; A manual of laboratory methods. 2nd ed. En: Implementación y evaluación de los métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). Parra S., Pérez M., Bernal M., Suárez Z. y Montoya D. 2006.

Ledermann W. 2007. *Pseudomonas* una bella oportunista. En: Ledermann W. Una Historia personal de las bacterias. Chile: Ril Editores. cap 7, p. 340.

Morihara K. 2005 In: D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Stanley, G. M. Garrity (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York; 2:330.

Palleroni N. J. *Pseudomonas*. 2005. In: D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Stanley, G. M. Garrity (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York; 2:323-379.

Pesci C., and Iglewski B. 1999. In: *Cell-Cell Signaling in Bacteria*, eds. Dunny, G. M. & Winans, S. C. (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC), pp. 147–155.

Phillips N. J., John C. M., Reinders L. G., Gibson B. W., Apicella M. A. and Griffiss J. M. 1990. Structural models for the cell surface lipooligosaccharides of *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*, *Biomed. Environ. Mass Spectr.* 19:731–745.

Romero R. 2007 *Pseudomonas*. En: Romero R. Microbiología y Parasitología Humana. 3a ed. Mexico: Editorial medica panamericana. cap. 78, p. 876.

Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 2002. In: Bacteriocins Evolution, ecology and application. Riley M. A. and Wertz J. E. Annu. Rev. Microbiol. 56:117-137

Veron, M. and Berche P. 2005. In: D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Stanley, G. M. Garrity (Eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. Springer-Verlag. New York; 2:355-358.

Weitzman, P.D.J. and D. Jones. 2005 In: D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Stanley, G. M. Garrity (Eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. Springer-Verlag. New York; 2:329.

# **ANEXOS**

**ANEXO 1. Cepas *Pseudomonas spp* aisladas de suelo.**

N° cepa	Crecimiento Agar Cetrimide/ pigmento verde-azulado	Coloración Gram	Movilidad	Oxidasa	Catalasa	Licuefacción gelatina	Crecimiento a 42°C
<b>ATCC 27853</b>	+/+	BGN	+	+	+	+	+
1	+/+	BGN	+	+	+	+	+
2	+/-	BGN	+	+	+	+	-
3	+/+	BGN	+	+	+	+	+
4	-/-						
5	-/-						
6	-/-						
7	+/+	BGN	+	+	+	+	+
8	-/-						
9	-/-						
10	-/-						
11	-/-						
12	-/-						
13	+/-	BGN	+	+	+	+	-
14	+/-	BGN	+	+	+	+	-
15	-/-						
16	-/-						
17	-/-						
18	+/-	BGN	+	+	+	+	-
19	+/+	BGN	+	+	+	+	+
20	-/-						
21	-/-						
22	+/+	BGN	+	+	+	+	+
23	+/+	BGN	+	+	+	+	+
24	-/-						
25	+/-	BGN	+	+	+	+	-
26	-/-						
27	-/-						
28	-/-						

29	-/-						
30	-/-						
31	+/+	BGN	+	+	+	+	+
32	+/-	BGN	+	+	+	+	-
33	-/-						
34	+/+	BGN	+	+	+	+	+
35	+/+	BGN	+	+	+	+	+
36	-/-						
37	-/-						
38	-/-						
39	-/-						
40	-/-						
41	-/-						
42	-/-						
43	-/-						
44	-/-						
45	-/-						
46	+/-	BGN	+	+	+	+	-
47	+/+	BGN	+	+	+	+	+
48	-/-						
49	-/-						
50	-/-						
51	+/-	BGN	+	+	+	+	-
52	+/+	BGN	+	+	+	+	+
53	+/+	BGN	+	+	+	+	+
54	+/-	BGN	+	+	+	+	-
55	+/-	BGN	+	+	+	+	-
56	-/-						
57	-/-						
58	-/-						
59	-/-						
60	-/-						

A partir de 60 muestras de suelo, se obtuvo 22 cepas de *Pseudomonas spp.*  de donde se identificó 12 cepas como *Pseudomonas aeruginosa*  Se utilizó como cepa patrón para las pruebas de identificación, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

**ANEXO 2. Determinación de la susceptibilidad antibiótica en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes hábitats**

Hábitat Agua	Diámetro de los halos (mm)				
	AK	G	CIP	CFP	FTZ
1A	8	20	13	30	10
2A	22	12	7	24	12
3A	22	10	14	30	10
4A	12	9	10	30	9
5A	25	20	15	29	11
6A	25	9	8	30	13
7A	7	8	9	30	13
8A	24	11	11	28	8

Hábitat Suelo	Diámetro de los halos (mm)				
	AK	G	CIP	CFP	FTZ
1 S	24	22	24	26	24
2 S	22	22	40	24	24
3 S	24	20	34	24	22
4 S	20	16	38	24	20
5 S	22	16	36	22	22
6 S	22	16	38	26	22
7 S	22	18	32	24	22
8 S	24	20	26	24	22
9 S	22	20	33	26	22
10 S	24	14	35	25	24
11 S	22	20	34	22	21
12 S	22	18	28	24	22

Hábitat Clínico	Diámetro de los halos (mm)				
	AK	G	CIP	CFP	FTZ
1 C	28	22	13	18	11
2 C	21	14	17	11	14
3 C	30	13	19	17	30
4 C	15	24	16	17	25
5 C	24	6	30	24	10
6 C	25	22	18	22	21
7 C	26	22	39	9	26
8 C	23	20	34	16	22
9 C	24	24	36	19	16
10 C	28	20	28	22	22
11 C	24	14	12	22	22
12 C	26	21	33	18	17

Tabla de contingencia: Resistencia de Antibióticos en cepas Pseudomonas aeruginosa				
Hábitat	Antibiótico	Susceptible	Resistente	TOTAL
AGUA	AK	5	3	8
	G	2	6	8
	CIP	0	8	8
	CFP	8	0	8
	FTZ	0	8	8
	<b>TOTAL</b>	15	25	40
SUELO	AK	12	0	12
	G	12	0	12
	CIP	12	0	12
	CFP	12	0	12
	FTZ	12	0	12
	<b>TOTAL</b>	60	0	60
CLINICO	AK	1	11	12
	G	8	4	12
	CIP	6	6	12
	CFP	4	8	12
	FTZ	7	5	12
	<b>TOTAL</b>	26	34	60

Para identificar el comportamiento de las cepas ante la acción de los antimicrobianos se hizo uso de los Estándares de susceptibilidad Antibiótica CLSI (2006), para los 5 agentes utilizados.

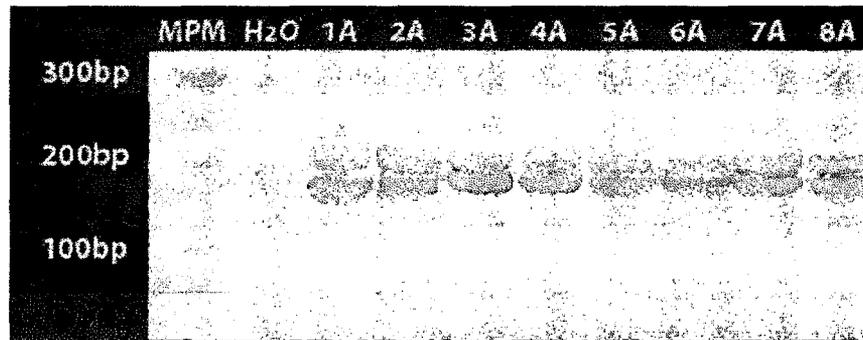
Agente antimicrobiano	Sigla	Potencia (mcg)	Resistencia (mm)	Susceptibilidad (mm)
AMIKACINA	AK	30	≤14	≥17
GENTAMICINA	GE	10	≤12	≥15
CIPROFLOXACINO	CIP	5	≤15	≥21
CEFOPERAZONA	CFP	75	≤15	≥21
CEFTAZIDIMA	FTZ	30	≤14	≥18

### ANEXO 3. Pruebas de caracterización en las 32 cepas *Pseudomonas aeruginosa*

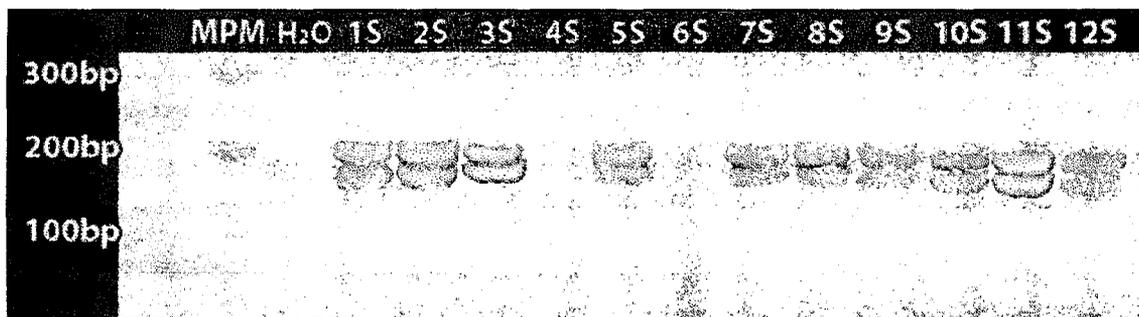
CEPAS	Agar P		Agar F	Inhibición frente a <i>H. pylori</i>			PCR		
	Piocianina	Piorrubina/ Piomelanina	Pioverdina	Sin tratamiento UV	Con tratamiento UV			PAO617	PAO628
					ATCC 43504	J99	G27		
ATCC 27853	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
1A	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
2A	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
3A	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
4A	(+)	(+)	(-)	(-)	15	10	10	(+)	(+)
5A	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
6A	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
7A	(+)	(-)	(-)	(-)	11	10	12	(+)	(+)
8A	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
1S	(+)	(+)	(-)	(-)	14	12	13	(+)	(+)
2S	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
3S	(+)	(+)	(-)	(-)	10	9	9	(+)	(+)
4S	(+)	(+)	(-)	(-)	13	12	13	(-)	(-)
5S	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
6S	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7S	(+)	(+)	(+)	(-)	11	10	10	(+)	(+)
8S	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
9S	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
10S	(+)	(+)	(+)	(-)	14	12	12	(+)	(+)
11S	(+)	(+)	(+)	(-)	10	10	9	(+)	(+)
12S	(+)	(+)	(-)	(-)	27	25	24	(+)	(+)
1C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
2C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
3C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
4C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
5C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
6C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
7C	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
8C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
9C	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
10C	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
11C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
12C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)

## ANEXO 4. Determinación de genes piocina R por PCR multiple en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* incluidas en este estudio.

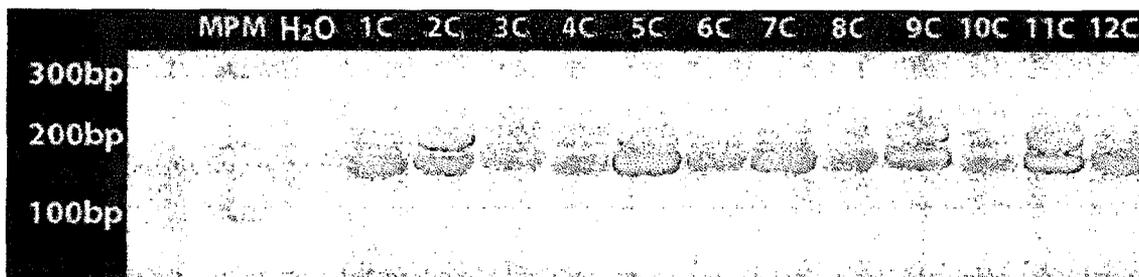
### Hábitat Agua



### Hábitat Suelo



### Hábitat Clínico



- Para todos los casos se utilizo Marcador de peso molecular (50pb DNA Ladder)
- La visualización se realizo por transiluminador UV en gel agarosa al 1.6%, teñido con RedGel 3X

**ANEXO 5. Datos obtenidos en la cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 12S**

<b>Tiempo (Hr)</b>	<b>O.D. (625nm)</b>	<b>Halos de inhibición frente <i>H. pylori</i> ATCC 43504</b>
<b>0</b>	0.024	-
<b>2</b>	0.03	-
<b>4</b>	0.048	-
<b>6</b>	0.062	-
<b>8</b>	0.115	-
<b>10</b>	0.224	-
<b>23</b>	0.748	10mm
<b>26</b>	0.754	15mm
<b>29</b>	0.814	21mm
<b>31</b>	0.819	28mm

**Anexo 6. Datos obtenidos durante la cinética de muerte de *Helicobacter pylori* ATCC 43504**

Tiempo (Hr)	Recuento de células viables ( $\times 10^6$ ufc/ml)			
	Control Positivo	CMI	2XCMI	Control negativo
0	3	3	3	3
2	2.5	1.8	1.7	3
4	1.75	1.3	0.95	3
7	0.53	0.2	0.18	2.6
10	0.28	0.16	0.16	3.7
24	0.0052	0.004	0	8

Control positivo: Cultivo de *H. pylori* en caldo BHI y Amoxicilina (0.12 $\mu$ g/ml)

Control negativo: Cultivo de *H. pylori* en caldo BHI.

CMI: Dilución 1:8 del extracto crudo de *P. aeruginosa* cepa 12S

2xCMI: Dilución 1:4 del extracto crudo de *P. aeruginosa* cepa 12S

## ANEXO 7-A

### DIFERENCIA ENTRE HÁBITAT AMBIENTAL Y CLINICO

#### *Planteamiento de hipótesis*

Ho = Las diferencias que se observan en la frecuencia de inhibición (positivo o negativo), en los hábitat se deben al azar. Es decir que la inhibición de *P. aeruginosa* frente a *H. pylori* es independiente del hábitat del cual fue aislada.

Ha = Las diferencias que se observan en la frecuencia de inhibición (positivo o negativo), en los hábitat, no se deben al azar. Es decir que la inhibición de *P. aeruginosa* frente a *H. pylori* es dependiente del hábitat del cual fue aislada.

#### *Nivel de significación*

Para todo valor de probabilidad igual o menor que 0.05, se acepta Ha y se rechaza Ho.

**Tabla de contingencia Inhibición \* Hábitat**

			Hábitat		Total
			Natural	Clínico	
Inhibición	Negativo	Recuento	11	12	23
		Frecuencia esperada	14,4	8,6	23,0
	Positivo	Recuento	9	0	9
		Frecuencia esperada	5,6	3,4	9,0
Total		Recuento	20	12	32
		Frecuencia esperada	20,0	12,0	32,0

#### **Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7,513 <sup>a</sup>	1	,006		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	5,452	1	,020		
Razón de verosimilitudes	10,499	1	,001		
Estadístico exacto de Fisher				,012	,006
Asociación lineal por lineal	7,278	1	,007		
N de casos válidos	32				

a. 1 casillas (25.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3.38.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

#### *Interpretación*

El test exacto de Fisher da un valor de  $p=0.012$ , y podemos afirmar que la diferencia es estadísticamente significativa. Aceptamos la hipótesis alternativa.

Existe evidencia de una asociación estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ) en cepas de *P. aeruginosa* de presentar inhibición frente a *H. pylori* y el hábitat del que provienen. Es decir que la inhibición es dependiente del hábitat del que provienen ya que sería muy extraño que las diferencias encontradas fuesen simplemente explicadas por el azar.

**ANEXO 7-B**

**DIFERENCIA ENTRE HABITAT SUELO Y AGUA**

**Tabla de contingencia Hábitat \* Inhibición**

			Inhibición		Total
			Negativo	Positivo	
Hábitat	Agua	Recuento	6	2	8
		Frecuencia esperada	4,4	3,6	8,0
	Suelo	Recuento	5	7	12
		Frecuencia esperada	6,6	5,4	12,0
Total		Recuento	11	9	20
		Frecuencia esperada	11,0	9,0	20,0

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,155 <sup>a</sup>	1	,142		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	1,019	1	,313		
Razón de verosimilitudes	2,228	1	,136		
Estadístico exacto de Fisher				,197	,157
Asociación lineal por lineal	2,047	1	,152		
N de casos válidos	20				

a. 2 casillas (50.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3.60.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

*Interpretación*

El test exacto de Fisher da un valor de  $p=0.197$ . No rechazamos la hipótesis nula.

No existe evidencia de una asociación estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ) en cepas de *P. aeruginosa* de presentar inhibición frente a *H. pylori* y el hábitat del que provienen, es decir, la inhibición es independencia del hábitat, y las diferencias que se pueden observar podrían deberse al azar.

## ANEXO 7-C

### DIFERENCIA HALOS DE INHIBICION FRENTE A TRATAMIENTO DE TRIPSINA

#### *Planteamiento de hipótesis*

Ho = Los rangos promedio de los halos de inhibición control y tratados con tripsina, son iguales.

Ha = Los rangos promedio de los halos de inhibición control y tratados con tripsina, son diferentes

#### *Nivel de significación*

Para todo valor de probabilidad igual o menor que 0.05, se acepta Ha y se rechaza Ho.

#### **Estadísticos descriptivos**

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Control	9	13,78	5,761	9	28
Tripsina	9	13,11	6,431	7	29

#### **Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon**

##### **Rangos**

	N	Rango promedio	Suma rangos de
Tripsina - Control Rangos negativos	4 <sup>a</sup>	3,38	13,50
Rangos positivos	1 <sup>b</sup>	1,50	1,50
Empates	4 <sup>c</sup>		
Total	9		

a. Tripsina < Control

b. Tripsina > Control

c. Tripsina = Control

##### **Estadísticos de contraste<sup>p</sup>**

	Tripsina - Control
Z	-1,656 <sup>a</sup>
Sig. asintót. (bilateral)	,098

a. Basado en los rangos positivos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

#### *Interpretación*

No existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) para rechazar la hipótesis nula.  $p = 0.098$ . Los rangos promedio de los halos de inhibición control y tratados con tripsina son iguales.

## ANEXO 7-D

### DIFERENCIA HALOS DE INHIBICION FRENTE A TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA

#### *Planteamiento de hipótesis*

Ho = Los rangos promedio de los halos de inhibición, entre el control y los diferentes tratamientos de temperatura, son iguales.

Ha = Los rangos promedio de los halos de inhibición, entre el control y los diferentes tratamientos de temperatura son diferentes, al menos entre dos temperaturas.

#### *Nivel de significación*

Para todo valor de probabilidad igual o menor que 0.05, se acepta Ha y se rechaza Ho.

#### **Estadísticos descriptivos**

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Temp. Control	9	13,78	5,761	9	28
Temp. 60°C	9	13,33	5,958	8	28
Temp. 90°C	9	13,67	5,874	8	28
Temp. 120°C	9	13,33	5,500	8	27

#### **Prueba de Friedman**

##### **Rangos**

	Rango promedio
Temp. Control	3,00
Temp. 60°C	2,17
Temp. 90°C	2,78
Temp. 120°C	2,06

##### **Estadísticos de contraste<sup>a</sup>**

N	9
Chi-cuadrado	6,574
gl	3
Sig. asintót.	,087

a. Prueba de Friedman

#### *Interpretación*

El estadístico calculado 6,574 con 3 grados de libertad tiene una  $p > 0.05$  ( $p = 0.087$ ), y podemos afirmar que no existe una diferencia estadísticamente significativa. Aceptamos la hipótesis nula.

## ANEXO 8

Chile, 19 de Abril de 2011.

Estimados Señores:

Mediante la presente certifico que las cepas *Helicobacter pylori* ATCC 43504, J99 y G27 fue donada al Centro Latinoamericano de Referencia en *Helicobacter pylori* (CLAHP) por el Dr. Guillermo I. Pérez-Pérez. Associate Professor of Medicine and Microbiology. Department of Medicine and Microbiology. New York University School of Medicine Institution Mailing Address:

6027W VAMC, 423 East 23d. Street

New York NY 10010

tel. 212-263-4101

fax. 212-263-4108

Garantizo que estas cepas han mantenido sus características originales, las que son permanentemente chequeadas y que mantienen su viabilidad mediante trasposos sucesivos.

Atte.,



Dra. Apolinaria García Cancino

Director Científico

Centro Latinoamericano de Referencia en *Helicobacter pylori*

