

## Artículo Original

### Bacteriología

Kasmera 48(1):e48130843, Enero-Junio, 2020

ISSN 0075-5222 E-ISSN 2477-9628

 <https://doi.org/10.5281/zenodo.3870643>



# Estudio de la Inhibición de formación de biopelículas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de própolis

## *Inhibition study of biofilms production of Pseudomonas aeruginosa strains in the presence of propolis*

Abadía-Patiño Lorena <sup>1</sup>, Bravo-Rodríguez Carlos Enrique <sup>2</sup>, Prin José Luís <sup>3</sup>, Mosqueda-Paraqueimo Saul José <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas. Departamento de Biomedicina. Departamento de Bioanálisis. Laboratorio de Resistencia Bacteriana. Cumaná-Sucre. Venezuela. <sup>2</sup>Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Departamento de Bioanálisis. Cumaná-Sucre. Venezuela. <sup>3</sup>Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas. Departamento de Ciencias de los Materiales. Cumaná-Sucre. Venezuela. <sup>4</sup>Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Departamento de Matemáticas. Cumaná-Sucre. Venezuela

### Resumen

Uno de los principales fracasos de los tratamientos antibióticos de las infecciones por *P. aeruginosa*, es debido a la producción de biopelículas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la inhibición de formación de biopelículas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de própolis. A todas las cepas se les determinó el perfil de susceptibilidad y se hicieron pruebas de sinergismo. Se detectó el nivel de producción de biopelículas sobre membranas de nitrocelulosa y por microscopía electrónica de transmisión. Se estudió la inhibición de las biopelículas por própolis por dilución en placas. En el hospital de Cumaná, "Dr. Julio Rodríguez", se aislaron cepas de *P. aeruginosa*, de diferentes procesos infecciosos, principalmente, pie diabético. Todas las cepas produjeron biopelículas a diferentes niveles (leve 60%, moderado 24% e intenso 16%). Sesenta por ciento de las cepas son productoras de MBL y 49% de AmpC. El antibiograma predominante fue la resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas (XII). Siete cepas fueron resistentes a colistin. Las biopelículas tratadas con própolis (10 µg/ml), fueron inhibidas con éxito en su casi totalidad. En conclusión, el própolis logró erradicar la formación de biopelículas *in vitro*, rompiendo las barreras de los diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos expresados por las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas en este trabajo.

**Palabras claves:** infecciones, antibióticos, Gram negativos, antibiogramas

### Abstract

One of the main failures of antibiotics treatments of *P. aeruginosa* infections is due to the production of biofilms. The objective of this work was to study the inhibition of biofilm production in *Pseudomonas aeruginosa* strains in the presence of propolis. Susceptibility testing and synergism were performed in all strains. Biofilm production level was determined onto nitrocellulose membranes and transmission electronic microscopy. Biofilm inhibition propolis was did on plate dilution. "Dr. Julio Rodríguez" hospital, in Cumaná, *P. aeruginosa* strains were isolated from different infectious processes, mainly diabetic foot. All the strains produced biofilm at different levels (60% mild, 24% moderate and 16% high). Sixty percent of the strains are producers of MBL, and 49% of AmpC. The predominant antibiotype was resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones (XII). Seven strains were resistant's to colistin. Biofilms treated with propolis (10 µg/ml) were almost completely inhibited. In conclusion, the propolis achieved to eradicate the *in vitro* biofilm production, breaking the barriers of the different mechanisms of resistance to the antibiotics expressed by the *P. aeruginosa* strains studied in this work.

**Keywords:** infections, antibiotics, Gram negatives, antimicrobial susceptibility testing

**Recibido:** 24-01-2020

**Aceptado:** 19-05-2020

**Publicado:** 05-06-2020

**Como Citar:** Abadía-Patiño L, Bravo-Rodríguez CE, Prin JL, Mosqueda-Paraqueimo SJ. Estudio de la Inhibición de formación de biopelículas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de própolis. Kasmera. 2020;48(1):e48130843. doi: 10.5281/zenodo.3870643

**Autor de Correspondencia:** Abadía-Patiño Lorena. E-mail: [biociencia2013@gmail.com](mailto:biociencia2013@gmail.com)

Una lista completa con la información detallada de los autores está disponible al final del artículo.

©2020. Los Autores. **Kasmera**. Publicación del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Tropicales de la Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons atribución no comercial (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre y cuando la obra original sea debidamente citada.



## Introducción

Las biopelículas son comunidades heterogéneas dinámicas, formadas por microorganismos que sintetizan y secretan una matriz protectora que se adhiere firmemente a una superficie biótica o abiótica, en la que las bacterias quedan incrustadas en una barrera densa y viscosa de azúcares y proteínas (1). Los microorganismos embebidos dentro de la biopelícula, adquieren una resistencia tanto a los antibióticos como a los detergentes (2).

*Pseudomonas aeruginosa* causa infecciones, particularmente severas, en individuos susceptibles, a pesar de ser un patógeno oportunista (3). Esto lo logra debido a su gran capacidad de producir biopelículas, en diferentes superficies (4). Este bacilo Gram negativo, causa aproximadamente, 51 000 muertes anuales en Estados Unidos, debido a los altos niveles de resistencia antibiótica, lo cual, impide una instauración adecuada de tratamiento (5-6).

Y es que *P. aeruginosa*, exhibe múltiples mecanismos de resistencia, tanto intrínsecos como adquiridos, incluyendo, permeabilidad disminuida, bombas de flujo, enzimas inactivadoras de antibióticos, todo ello, alterando la efectividad de los betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y polimixinas (7). Las cepas son consideradas multidrogaresistentes (MRD), cuando tienen resistencia a más de un antibiótico en al menos tres categorías. Extensamente resistentes (XDR), cuando hay resistencia en más de un agente en todas las categorías y pandrogaresistentes (PDR) cuando las cepas no son sensibles a ninguno de los antibióticos disponibles (8). Estas cepas surgen, cuando hay confluencia de varios mecanismos en la misma cepa, debido a la presión selectiva del medio (9).

Aparte de presentar estos mecanismos de resistencia, la producción de biopelículas, imposibilita el tratamiento de infecciones producidas por *P. aeruginosa*, ya que los antibióticos son incapaces de penetrar la matriz extracelular de exopolisacáridos (10), permitiendo que los microorganismos crezcan a una tasa metabólica baja por la carencia de nutrientes (11).

El própolis es una resina producida por las abejas melíferas (*Apis mellifera*). Su apariencia física es variable, dependiendo de las flores que visitan las abejas, puede ser ocre, rojo, pardo, marrón claro o verde. El própolis puede ser friable y firme, o gomoso y elástico (12-13), y posee acción tanto bactericida, como bacteriostática. Tiene actividad antimicrobiana en cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos (14); su presencia protege la colonia de abejas de enfermedades infecciosas por su alta eficacia antiséptica (15). Dependiendo del origen del própolis, cambian sus compuestos, pudiendo llegar a describirse hasta 150 componentes diferentes (16).

Desde el siglo XVII, el própolis, es considerado un medicamento oficial por la farmacopea londinense (17). Esta sustancia, tiene principalmente flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos y ácidos aromáticos. Gracias a sus

características lipofílicas, se disuelven en alcoholes (18). El própolis, tiene varias actividades biológicas, como actividad antineoplásica (19), antiinflamatoria (20), antimicrobiana (18), antibiopelícula (21) y antioxidante (18). Debido a lo expuesto anteriormente, el presente trabajo tiene como finalidad estudiar la inhibición de formación de biopelículas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de própolis.

## Métodos

**Tipo y diseño de la investigación:** estudio descriptivo, prospectivo de carácter transversal y experimental.

**Obtención de muestras:** se estudiaron 37 cepas donadas por la Lcda. Mónica Becerra, del cepario existente en el Laboratorio de Bacteriología del hospital "Dr. Julio Rodríguez", de Cumaná, Estado Sucre, durante el mes de febrero 2014.

### Metodología

**Susceptibilidad antimicrobiana:** se utilizó el método de difusión en disco, siguiendo los lineamientos de la tabla 2B-1 del Manual M100-S26. Se emplearon los discos de: piperacilina-tazobactam (100/10 µg), ceftazidime (30 µg), cefepime (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), colistin (10 µg), gentamicina (10 µg) y amikacina (30 µg). Se usaron *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, como cepas controles (22).

**Detección de AmpC plasmídica:** se realizó con la prueba del disco para AmpC. Se inoculó una placa de agar Mueller-Hinton con la cepa *E. coli* ATCC 25922 ajustadas a una turbidez equivalente al patrón 0.5 McFarland. Se prepararon papeles de disco (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) con 20 µl de Tris-EDTA, se secaron y almacenaron en la nevera. Al momento de montar la prueba, cada disco se rehidrató con solución salina y varias colonias a ser probadas para la producción de AmpC. Un disco por cada cepa. Un disco de cefoxitina (30 µg) fue colocado en el centro de dos discos de colonias con las cepas a ser probadas. En una misma placa, se pudieron probar hasta 6 cepas. Las cepas productoras de AmpC plasmídica, crecieron alrededor del disco de antibióticos, mientras que las que no produjeron la enzima, no crecieron alrededor el disco (23).

**Detección de metalo-betalactamasas (MBL):** para detectar la presencia de MBL se utilizó un disco de ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), el cual se colocó entre los discos de imipenem y meropenem (24).

**Pruebas de sinergismo:** se inocularon placas con agar Mueller-Hinton con suspensiones bacterianas ajustadas a una turbidez equivalente al patrón 0.5 McFarland. Luego se colocaron discos del antimicrobiano en serie en forma de L, sobre la superficie del agar previamente inoculado. Las combinaciones ensayadas fueron: ciprofloxacina con gentamicina y piperacilina-tazobactam con gentamicina (25).

**Formación de biopelículas sobre membranas de nitrocelulosa:** se utilizaron membranas de nitrocelulosa

estériles (poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ), colocadas sobre la superficie del agar BHI. Las membranas se inocularon con 10  $\mu\text{l}$  de una suspensión de *P. aeruginosa*, en fase exponencial (densidad óptica entre 0.08 y 0.1) a una longitud de onda de 600 nm. Se dejaron en incubación a 35°C por 16-18 horas. Terminado el tiempo de incubación, se procedió a raspar con un bisturí estéril todo el crecimiento bacteriano sobre la superficie de la membrana de nitrocelulosa. Este raspado fue leído en el espectrofotómetro usando como blanco caldo BHI estéril. Los resultados de todas las lecturas fueron comparados entre sí para realizar una clasificación de acuerdo a la producción de biopelícula: leve, moderado o intenso (26).

**Estudio de la producción de biopelículas por microscopía electrónica de transmisión (MET):** se introdujo una rejilla de 3 mm de diámetro preparada de 100 mesh, en los pozos de las placas de ELISA inoculados con las cepas en caldo BHI (incubados por 16-18 horas a 35°C); las rejillas se sacudieron para eliminar el exceso de muestra, luego se sometieron a ácido fosfotúngstico al 1% (tinción negativa) por 1 minuto, se secaron por los bordes las rejillas y se observaron en el MET. Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión (MET), modelo H-600, marca HITACHI con un voltaje de aceleración de 100 Kv en modo de señal de campo claro (27).

**Acción del própolis sobre la biopelícula:** de acuerdo al nivel de producción de biopelícula, se seleccionaron cepas al azar según la tabla de números aleatorios. La inhibición de la formación de biopelícula fue estudiada por la modificación de la técnica sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se inocularon con 10  $\mu\text{l}$  de una suspensión de *P. aeruginosa*. Posterior a ello, se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de própolis a diferentes concentraciones (10, 50, 100, 250, 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ ). Las placas fueron incubadas por 24 horas a 35°C. Los resultados de desarrollo de los microorganismos en el interior de la biopelícula con los diferentes tratamientos se compararon con el control positivo de desarrollo al cual se le adicionó la misma cantidad de microorganismos y posteriormente se trató con solución salina para determinar en qué proporción el própolis inhibe la producción de biopelícula (14).

**Conteo de colonias:** posteriormente al período de incubación, las membranas de nitrocelulosa se trasladaron a tubos de ensayo con 9 ml de buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). Las biopelículas formadas fueron disgregadas en el vortex por tres minutos. Se hicieron diluciones seriadas en PBS, de las suspensiones obtenidas, después del tratamiento de disgregación, contemplando una dilución mayor de  $10^{-10}$ , el conteo se realizó usando la técnica de microdilución en placa en agar BHI, la cual consistió en realizar cinco inóculos de 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las diluciones correspondientes. El conteo de las unidades formadoras de colonias se realizó 24 horas después de ser incubadas a 35°C (28).

**Recolección de la información:** las características epidemiológicas de los pacientes a quienes se les aislaron cepas de *P. aeruginosa* durante su estancia en el hospital

Dr. Julio Rodríguez, se hizo, mediante un formulario, en el cual se solicitaba nombre completo del paciente, edad, el sitio de la toma de la muestra; si estaba bajo tratamiento antibiótico o no y cuál antibiótico, si estaba hospitalizado o era ambulatorio, cama donde se encontraba, sala de hospitalización, si se habían aislado otros microorganismos en el mismo cultivo, para el posterior análisis de los resultados.

**Análisis estadístico:** los datos de todos los experimentos fueron vaciados en una hoja Excel para poder cotejar toda la información recolectada, realizar las tablas y presentar los resultados en porcentaje. Se empleó el programa SPSS® 20.0 para Windows. La prueba empleada fue el Análisis Bilateral de Varianzas de Friedman.

**Aspectos bioéticos:** Las muestras fueron tomadas a solicitud de los médicos tratantes de los pacientes. Nunca, un médico solicita el consentimiento del paciente para tomar una muestra en un centro de salud, para realizar un estudio bacteriológico, con el cual determinar el tratamiento a instaurar. Los investigadores de este trabajo, no solicitaron consentimiento informado a ningún paciente, porque fue un trabajo retrospectivo, a solicitud hecha por la Lcda. Mónica Becerra, debido a las limitaciones del laboratorio, dos años después de su aislamiento y conservación. Era imposible buscar a los pacientes a quienes se les aislaron las cepas, para solicitarles consentimiento informado, ya que muchas personas se han ido del país y otras han fallecido.

## Resultados

La casi totalidad de las cepas de *P. aeruginosa* (76%) analizadas en el presente estudio, se aisló de infecciones en miembros inferiores de pacientes diabéticos (13 de pie izquierdo y 15 de pie derecho) atendidos en el Hospital "Dr. Julio Rodríguez". No se usaron muestras de un mismo paciente, para evitar sesgos en la investigación. De 37 pacientes, 24 estaban bajo tratamiento antibiótico con cefalosporinas de tercera generación (ocho), aminoglucósidos (dos), fluoroquinolonas (cinco), glicopéptidos (uno), lincosaminas (cinco) y metronidazol (tres). Se hizo la reidentificación de las bacterias almacenadas en el cepario del Hospital "Dr. Julio Rodríguez", para verificar su pureza y estar seguros de que eran realmente cepas de *P. aeruginosa*, en el laboratorio de resistencia bacteriana del IBCAUUDO. Se obtuvieron 31 cepas de *P. aeruginosa* productoras de piocianina, cinco cepas de *P. aeruginosa* productoras de pioverdina y una cepa *P. fluorescens*. Comparar las cepas aisladas de los pacientes con la cama que ocuparon en el hospital, era fundamental, para reconocer contaminaciones cruzadas y posible diseminación clonal, la cual sería determinada por los antibiogramas de las cepas. De los pacientes hospitalizados, cinco estuvieron en la cama 22, tres en la cama 15, dos en la cama 4, dos en la cama 10 y dos en la cama 16, en tiempos diferentes. Con respecto a los pacientes ambulatorios, ocho habían sido curados en el servicio de atención ortopédica (SAO) del mismo hospital y siete venían remitidos de otros centros de salud. Según el laboratorio de bacteriología del hospital Dr. Julio

Rodríguez, hubo pacientes con cultivos mixtos, es decir, no hubo crecimiento puro de *P. aeruginosa*, sino que además se aislaron levaduras (uno), bacilos Gram negativos (uno) y cocos Gram positivos (dos) en los cultivos de los pacientes con pie diabético. En este estudio se encontró una cepa de *P. fluorescens* en el cultivo de un pie diabético.

Cincuenta y cuatro por ciento de las cepas, fueron resistentes a ciprofloxacina y a amikacina (Tabla 1). Sesenta por ciento de las cepas presentaron AmpC plasmídico (18 *P. aeruginosa* productoras de piodianina, tres *P. aeruginosa* productoras de pioverdina y la única cepa de *P. fluorescens*) y 49% son productoras de MBL.

**Tabla 1.** Perfil de susceptibilidad de cepas clínicas de *P. aeruginosa*, aisladas de pacientes del Hospital "Dr. Julio Rodríguez", en Cumaná, estado Sucre

Antibióticos	S % (Valor absoluto)	I % (Valor absoluto)	R % (Valor absoluto)
Piperacilina-Tazobactam	46 (17)	2 (1)	51 (19)
Ceftazidime	43 (16)	5 (2)	51 (19)
Cefepime	46 (17)	2 (1)	51 (19)
Imipenem	49 (18)	0 (0)	51 (19)
Meropenem	49 (18)	0 (0)	51 (19)
Colistin	81 (30)	0 (0)	19 (7)
Amikacina	46 (17)	0 (0)	20 (54)
Gentamicina	54 (20)	11(4)	34 (13)
Ciprofloxacina	43 (16)	2 (1)	54 (20)

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente.

Los antibiogramas XII y XV fueron los más representativos en este estudio (Tabla 2), siendo el XII el de las cepas AmpC positivas. Las cepas aisladas de pacientes de las camas 4 y 10, pertenecen a este antibiograma (datos no presentados). Dos cepas aisladas de los pacientes atendidos en el SAO están relacionadas entre sí, lo que hace un total de 6 cepas del antibiograma XII en diferentes sitios (datos no presentados).

En el presente estudio, el sinergismo entre gentamicina y piperacilina-tazobactam, fue de 26%, mientras que gentamicina con ciprofloxacina fue de 24%.

El nivel de formación de biopelícula, se midió en todas las cepas, encontrándose, que, 60% de las cepas tuvieron una producción leve (DO 0,100 – 0,199), 24% moderada (DO 0,200–0,299) y 16% intensa (DO ≥ 0,300).

Para determinar el poder inhibitorio del própolis, se seleccionó al azar, una cepa de cada grupo (leve, moderada e intenso) y se expusieron a distintas concentraciones de esta sustancia natural. Esto es importante determinarlo en cepas aisladas de casos de procesos infecciosos producidos por cepas multirresistentes, como las presentadas en este estudio. En este trabajo hubo que diluir las bacterias hasta  $10^{-15}$ , para poder observar su inhibición; esto debida a la cantidad de biopelículas producidas por las cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

**Tabla 2.** Antibiogramas de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes del Hospital "Dr. Julio Rodríguez" en Cumaná, estado Sucre

Antibiograma	Cepas	FEP	CAZ	PTZ	IMP	MER	AK	GEM	CIP	CL
I	1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
II	1	R	R	R	R	R	R	I	R	R
III	3	R	R	R	R	R	R	R	R	S
IV	2	R	R	R	R	R	R	I	R	S
V	1	R	R	R	R	R	R	S	R	R
VI	2	R	R	R	R	R	R	S	R	S
VII	2	R	R	R	R	R	S	S	S	R
VIII	1	R	R	R	R	R	R	S	S	S
IX	3	R	R	R	R	R	S	S	S	S
X	2	R	R	R	R	R	S	S	S	R
XI	1	R	R	R	R	R	S	S	I	S
XII	9	S	S	S	S	S	R	R	R	S
XIII	1	I	I	I	S	S	S	I	R	S
XIV	1	S	I	S	S	S	S	S	S	S
XV	7	S	S	S	S	S	S	S	S	S

FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidime, TZP: Piperacilina-tazobactam, MER: Meropenem, IMP: Imipenem, AMK: Amikacina, GM: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina, CL: Colistin.

En la cepa 6D9, de producción leve de biopelícula, disminuyó la población bacteriana de  $10^{14}$  a  $10^{11}$  UFC/ml con  $10 \mu\text{g/ml}$  de própolis; con concentraciones mucho más altas ( $50$  a  $1000 \mu\text{g/ml}$ ), se logró inhibir la producción casi por completo ( $1$  UFC/ml). La cepa 6F7, de producción intensa, también se inhibió con própolis a todas las concentraciones (Tabla 3).

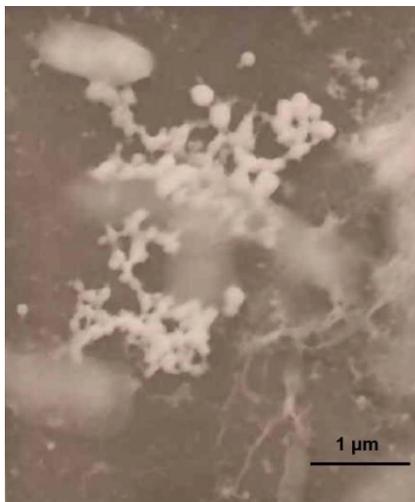
La producción de biopelícula en cepas de *P. aeruginosa*, también fue estudiada mediante el uso de MET (Tabla 4). Usando esta herramienta se pudo observar las características morfológicas y estructurales de las mismas. Se obtuvieron biopelículas con densidades variables, razón por la cual no fue posible tener una imagen clara de todas las cepas estudiadas, ya que, el haz de electrones no fue capaz de atravesar las más densas. Desde un punto de vista general se evidenció que las características observadas mediante esta metodología se relacionaron con los resultados obtenidos cuando se cuantificó la producción de biopelículas en la cepa nivel leve (Figura 1). Se pudo constatar la disminución de la carga bacteriana con el uso de própolis en las micrografías de la MET (Figura 2). Se aplicó la prueba de Análisis Bilateral de Varianzas de Friedman, dado que las muestras de cada grupo son independientes, en el nivel de significancia del 1%, el valor del estadístico de prueba Chi cuadrado arrojó un valor de 36,39. Lo que indica que sí existen diferencias significativas en la aplicación de própolis con respecto al nivel de inhibición de las biopelículas producidas por *Pseudomonas*.

**Tabla 3.** Efecto inhibitor del própolis sobre biopelículas de producción intensa por una cepa clínica de *P. aeruginosa* sobre membranas de nitrocelulosa

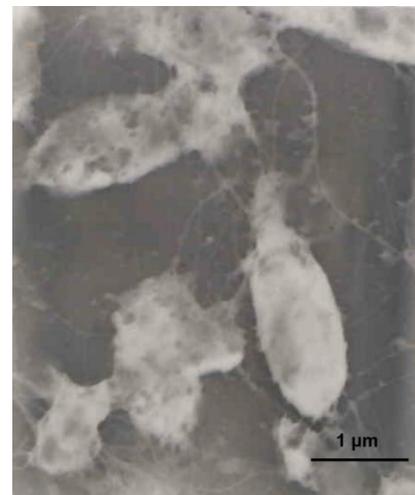
		UFC/ml						
Dilución de las Bacterias	(1x10 <sup>-11</sup> )	99 x 10 <sup>15</sup>	88 x 10 <sup>14</sup>	39 x 10 <sup>13</sup>	20 x 10 <sup>12</sup>	11 x 10 <sup>11</sup>	2 x 10 <sup>10</sup>	1
	(1x10 <sup>-12</sup> )	86 x 10 <sup>13</sup>	44 x 10 <sup>11</sup>	28 x 10 <sup>9</sup>	10 x 10 <sup>7</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	1	1
	(1x10 <sup>-13</sup> )	35 x 10 <sup>11</sup>	22 x 10 <sup>9</sup>	17 x 10 <sup>7</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>3</sup>	1	1
	(1x10 <sup>-14</sup> )	12 x 10 <sup>10</sup>	9 x 10 <sup>7</sup>	9 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>3</sup>	1	1	1
	(1x10 <sup>-15</sup> )	3 x 10 <sup>9</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	1	1	1	1	1
Concentración de própolis (µg/ml)		0	10	50	100	250	500	1000

**Tabla 4.** Producción e inhibición de biopelículas de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* detectadas por Microscopía Electrónica de Transmisión

Nivel	UFC/ml	UFC/ml
	Sin própolis	Con própolis
Leve	2 x 10 <sup>17</sup>	1 x 10 <sup>10</sup>
Moderado	3 x 10 <sup>17</sup>	2 x 10 <sup>10</sup>
Intenso	5 x 10 <sup>20</sup>	4 x 10 <sup>12</sup>



**Figura 1.** Micrografía de la biopelícula de *P. aeruginosa* a nivel leve.



**Figura 2.** Micrografía de la biopelícula de *P. aeruginosa* a nivel leve, inhibida con própolis.

### Discusión

Al evaluar la capacidad productora de biopelículas de las cepas de *P. aeruginosa* de este estudio, se pudo demostrar que todas las cepas son productoras de la misma. Aunado a esto, a los mecanismos de resistencia a los antibióticos que presentan las cepas, las convierten en intratables, desde el punto de vista clínico. *P. aeruginosa* representa un problema importante de salud en los centros hospitalarios, especialmente, cuando causa infecciones en pacientes inmunosuprimidos, situación que se agudiza, debido a la resistencia natural y a su capacidad para adquirir mecanismos de resistencia, haciendo difícil su tratamiento (29-30).

En este estudio se aisló una sola cepa de *P. fluorescens*. Se ha descrito que *P. fluorescens* es un fitopatógeno asociado a hongos de la rizosfera de plantas (31) o de suelos (32), muy probablemente, fue aislada de un trabajador de la tierra, que trabaja descalzo o con calzado descubierto. Esta información no se pudo corroborar, porque el estudio fue hecho, dos años después con las cepas que se encontraban en el cepario del laboratorio de bacteriología del Hospital "Dr. Julio Rodríguez".

La producción de MBL es uno de los principales mecanismos de resistencia que posee *P. aeruginosa*. Estas enzimas, que se encuentran presentes en bacilos Gram negativos, hidrolizan los betalactámicos: penicilinas,

cefalosporinas y carbapenémicos (33). Este mecanismo contra los carbapenémicos es de gran relevancia clínica, ya que, estos antibióticos, son los pocos agentes disponibles para el tratamiento de infecciones producidas por patógenos Gram negativos multirresistentes (34). Más de 50% de las cepas de este estudio, presentan este mecanismo de resistencia. No es la primera vez que se detecta la producción de carbapenemasas en Venezuela, otros investigadores han reportado el mismo mecanismo (35-36).

Una de las combinaciones sinérgicas en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* en la República Checa, ha sido el uso de aztreonam con ciprofloxacina, en cepas productoras de biopelículas en Terapia Intensiva. En algunas ocasiones, las fluoroquinolonas aunadas a aminoglucósidos o estos últimos con betalactámicos han erradicado los procesos producidos por estas cepas (37). Los resultados de este trabajo son bajos, en comparación con los de la República Checa.

No existe un consenso a nivel internacional para el tratamiento de infecciones producidas por *P. aeruginosa* multirresistentes productoras de MBL. Algunos países, han diseñado esquemas terapéuticos con dos antibióticos, que por separado no demuestran perfil de sensibilidad, pero al combinarse, logran una acción sinérgica (38). Estas combinaciones de antibióticos no deben ser elegidas de forma empírica debido a que no existe una garantía de efectividad en las cepas clínicas de *P. aeruginosa* multirresistentes (39), por eso, se realizó esta prueba de sinergismo en las cepas aisladas de los pacientes del hospital "Dr. Julio Rodríguez".

En su ambiente natural las bacterias se desarrollan en biopelículas. Estas bacterias producen infecciones bacterianas crónicas y persisten en los tejidos del individuo infectado (40). En un estudio con cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística, se demostró que, en condiciones de aerobiosis, colistín es 100% efectivo. Con respecto a meropenem, solo tuvo 69% de efectividad, mientras que, cuando se probó con ciprofloxacina, se logró sinergismo (88% de efectividad); la combinación de meropenem y tobramicina aumentó a 93% de efectividad (41). En las cepas de Cumaná, el sinergismo no fue el esperado.

Ciertos autores consideran que las combinaciones con estas actividades son más efectivas que la monoterapia y podrían disminuir la probabilidad de aparición de subpoblaciones bacterianas resistentes a los antibióticos administrados (42). Las biopelículas generan un gradiente de anaerobiosis en el cual los antibióticos antipseudomónicos no son efectivos (43), por otro lado, la capa densa de la matriz de exopolisacáridos, no permite el paso de antibióticos con moléculas de gran tamaño (44).

La formación de biopelículas no se estudia en los laboratorios de bacteriología clínica, por lo que muchos investigadores concuerdan que los resultados obtenidos en los antibiogramas no son representativos del perfil de susceptibilidad de las bacterias involucradas en la biopelícula; esto debido a que las bacterias sometidas al

estudio en el antibiograma son células planctónicas y estos resultados no son extrapolables a bacterias que crecen dentro de una biopelícula (45), lamentablemente, en este laboratorio, no se disponía de los equipos necesarios para realizar la concentración mínima inhibitoria de biopelícula.

En el presente estudio, usando la metodología de formación de biopelícula en membrana de nitrocelulosa, se demostró que 100% de las cepas estudiadas tiene capacidad de producir biopelícula. Estos resultados confirman que *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos con mayor capacidad de producción de biopelículas. Además, dichos resultados difieren de estudios anteriores, en el que el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, encontró que 60% de las cepas de *P. aeruginosa* que ocasionan infecciones bacterianas fueron productoras de biopelículas (46).

En un estudio realizado con gentamicina y própolis, para inhibir la formación de biopelículas por cepas de *P. aeruginosa*, demostraron la erradicación de 81% de la biopelícula solo con própolis, mientras que con gentamicina, no fue efectivo (4). Hubiese sido interesante, poder determinar los componentes activos del extracto de própolis empleado en este estudio, para poder comparar con las otras sustancias descritas en la literatura y poder determinar cuáles son los componentes más efectivos entre todas las sustancias probadas.

Este estudio es importante, ya que, si se tratan pacientes diabéticos con própolis, que padecen infecciones en sus pies, se pudiera evitar la amputación de los miembros inferiores por los fracasos de tratamientos antibióticos. Actualmente, tanto el costo de los medicamentos, como la ausencia de una amplia gama de antibióticos para combatir infecciones en el país, limita mucho el porcentaje de éxito de esos tratamientos, aunado a los mecanismos de resistencia de las bacterias, que van en aumento, bien sea por acumulaciones de mutaciones o adquisición de determinantes de resistencia, vía horizontal (9).

El uso de varias sustancias para buscar el poder inhibitorio de las biopelículas producidas por bacterias patógenas, ha existido desde hace años. Se han probado sustancias como clorhexidina óxido nitroso, nitrofurazona, violeta de genciana (47), miel o própolis, con resultados alentadores (48). Se han hecho estudios para eliminar las infecciones producidas por biopelículas por *Staphylococcus aureus* con vancomicina y miel de Manuka y *P. aeruginosa* con la miel aunado con gentamicina (49).

En un estudio realizado con el própolis del Sahara en Argelia, se demostró que puede ser empleado como agente profiláctico, para impedir la formación de las biopelículas por *S. aureus* (0-20%), *P. aeruginosa* (16-65%) y *E. coli* (17-57%) seguido de una exposición de 48 horas de los dispositivos centrales (50). El nivel de inhibición, debe estar estrechamente correlacionado, con la cantidad de biopelícula que producen las cepas tratadas. En este estudio, se demostró que todas las cepas fueron inhibidas

en la formación de la biopelícula a diferentes concentraciones, contrariamente, a lo que reportan con el própolis del Sahara. Sería interesante repetir los experimentos exponiendo más tiempo las biopelículas con menores concentraciones, para evaluar el poder inhibitorio en función del tiempo de exposición.

En un estudio del monitoreo de la inhibición de la biopelícula por microscopía electrónica, con miel de Manuka y vancomicina, se demostró la acción sinérgica de ambos compuestos con la alteración de la estructura de la misma en el seno de colonias de *S. aureus*. En ese estudio se pudo incluso observar la distorsión de las células, aparte de la disminución de la matrix del exopolisacárido. En cuanto a las biopelículas formadas por *P. aeruginosa*, el efecto no fue sinérgico sino aditivo, con gentamicina (49). En este estudio no se usaron asociaciones de antibióticos con própolis, para inhibir la formación de las biopelículas, lo cual sería interesante considerarlo para posteriores análisis y ayudar a erradicar de forma más expedita las infecciones por estas bacterias multirresistentes.

Esa diferencia entre la capacidad de inhibir biopelículas por bacterias Gram positivas y Gram negativas, se puede deber a la composición de la pared de ambos grupos, ya que las Gram negativas tienen abundantes lípidos en su pared, que son eliminados con el etanol presente en el própolis, mientras que las Gram positivas, carecen de esa membrana externa (51). Sería conveniente, en futuros experimentos, probar cepas clínicas de *S. aureus* de procesos infecciosos graves, aisladas en Cumaná, para evaluar la capacidad inhibitoria del própolis.

La respuesta de *P. aeruginosa* en procesos infecciosos involucrados con biopelículas (pie diabético), a terapias combinadas de antibióticos es impredecible, por lo que una combinación de antibióticos elegidos empíricamente puede ser ineficaz. El própolis sería una buena opción en el tratamiento local de pacientes con pie diabético, aparte de la debridación, para eliminar la biopelícula formada por las bacterias. Por otro lado, los antibióticos sistémicos pueden no llegar al sitio de infección, debido a la mala circulación de miembros inferiores de esos pacientes. En conclusión, el própolis logró erradicar la formación de biopelículas *in vitro*, rompiendo las barreras de los diferentes mecanismos de resistencia a los diferentes antibióticos expresados por las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas en este trabajo.

### Conflicto de Relaciones y Actividades

Los autores declaran no presentar conflictos de relaciones ni actividades.

### Financiamiento

Los autores declaran no haber recibido ningún financiamiento para realizar el estudio aquí presentado.

### Agradecimientos

A la Licenciada. Mónica Becerra, por donar las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* del cepario del laboratorio de Bacteriología del Hospital "Dr. Julio Rodríguez" de Cumaná, estado Sucre, Venezuela. A la Bachiller Oreana Rodríguez, del Departamento de Bioanálisis del núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, por hacer unas pruebas de laboratorio.

### Referencias Bibliográficas

- Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* [Internet]. 1 de julio de 2009;11(7):1034-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x> DOI: [10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19374653/) PMID [19374653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19374653/) [Google Académico](https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=Abadía-Patiño)
- Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP. Role of Extracellular DNA in Initial Bacterial Adhesion and Surface Aggregation. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 15 de mayo de 2010;76(10):3405-8. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/76/10/3405.abstract> DOI: [10.1128/AEM.03119-09](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20363802/) PMID [20363802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20363802/) PMCID [PMC2869138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20363802/) [Google Académico](https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=Abadía-Patiño)
- Smith WD, Bardin E, Cameron L, Edmondson CL, Farrant K V, Martin I, et al. Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 15 de junio de 2017;364(14). Disponible en: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx121> DOI: [10.1093/femsle/fnx121](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28854668/) PMID [28854668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28854668/) [Google Académico](https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=Abadía-Patiño)
- Metó A, Colombari B, Metó A, Boaretto G, Pinetti D, Marchetti L, et al. Propolis affects *Pseudomonas aeruginosa* growth, biofilm formation, eDNA release and phenazine production: Potential involvement of polyphenols. *Microorganisms* [Internet]. 12 de febrero de 2020;8(2):243. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/2/243> DOI: [10.3390/microorganisms8020243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32059431/) PMID [32059431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32059431/) PMCID [PMC7074903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32059431/) [Google Académico](https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=Abadía-Patiño)
- Sligl WI, Dragan T, Smith SW. Nosocomial Gram-negative bacteremia in intensive care: epidemiology, antimicrobial susceptibilities, and outcomes. *Int J Infect Dis* [Internet]. 1 de agosto de 2015;37:129-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.06.024> DOI: [10.1016/j.ijid.2015.06.024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26159847/) PMID [26159847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26159847/) [Google Académico](https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=Abadía-Patiño)
- Lund-Palau H, Turnbull AR, Bush A, Bardin E, Cameron L, Soren O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2 de junio de 2016;10(6):685-97. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/17476348.2016.1177460> DOI: [10.1080/17476348.2016.1177460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27175979/) PMID [27175979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27175979/) [Google Académico](https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=Abadía-Patiño)
- Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context*. 2018;7:212527. Disponible en: <https://www.drugsincontext.com/how-to-manage-pseudomonas-aeruginosa-infections/> DOI: [10.7573/dic.212527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29872449/) PMID [29872449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29872449/) PMCID [PMC5978525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29872449/) [Google Académico](https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=Abadía-Patiño)
- El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer HP, Nasrallah GK, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future*

- Microbiol [Internet]. 1 de octubre de 2015;10(10):1683-706. Disponible en: <https://doi.org/10.2217/fmb.15.48> DOI: [10.2217/fmb.15.48](https://doi.org/10.2217/fmb.15.48) PMID [26439366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26439366/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26439366/)
9. Fujii A, Seki M, Higashiguchi M, Tachibana I, Kumanogoh A, Tomono K. Community-acquired, hospital-acquired, and healthcare-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Respir Med Case Reports [Internet]. 2014;12:30-3. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213007114000227> DOI: [10.1016/j.rmcr.2014.03.002](https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2014.03.002) PMID [26029534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26029534/) PMCID [PMC4061442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26029534/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26029534/)
  10. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1 de abril de 2002;15(2):167-93. Disponible en: <http://cmr.asm.org/content/15/2/167.abstract> DOI: [10.1128/CMR.15.2.167-193.2002](https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002) PMID [11932229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932229/) PMCID [PMC118068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932229/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932229/)
  11. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2010;35(4):322-32. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857910000099> DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011) PMID [20149602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20149602/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20149602/)
  12. R. Krell. Value-Added products from beekeeping. En: Value-Added products from beekeeping FAO Agricultural Services Bulletin No. 124 [Internet]. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1996. p. 31-3. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e14.htm>
  13. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. Evid Based Complement Alternat Med [Internet]. marzo de 2005;2(1):33-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15841276/> DOI: [10.1093/ecam/neh060](https://doi.org/10.1093/ecam/neh060) PMID [15841276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15841276/) PMCID [PMC1062153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15841276/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15841276/)
  14. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol [Internet]. 2005;100(1):114-7. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105003223> DOI: [10.1016/j.jep.2005.05.004](https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004) PMID [15993016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15993016/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15993016/)
  15. Bulman Z, Le P, Hudson AO, Savka MA. A novel property of propolis (bee glue): Anti-pathogenic activity by inhibition of N-acetyl-homoserine lactone mediated signaling in bacteria. J Ethnopharmacol [Internet]. 2011;138(3):788-97. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111007689> DOI: [10.1016/j.jep.2011.10.029](https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.029) PMID [22063726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22063726/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22063726/)
  16. Gil Marielsa, Colarusso Vanessa, Ferreira Jessica, Muñoz Anna, Rojas Tomás, Ochoa Greysys et al . Efecto de un extracto etanólico de propóleos sobre *Pseudomonas aeruginosa* en estado planctónico y sénil. Salus [Internet]. 2016 Abr; 20(1):27-33. Disponible en: <http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/salus2016/20-1/PSEUDOMONAS.pdf> [SciELO Redalyc Lilacs](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25562011000100004/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25562011000100004/)
  17. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia [Internet]. 2002;73(Suppl 1):S1-6. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X02001855> DOI: [10.1016/S0367-326X\(02\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00185-5) PMID [12495704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12495704/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12495704/)
  18. Dantas Silva RP, Machado BAS, Barreto G de A, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. PLoS One [Internet]. 30 de marzo de 2017;12(3):e0172585. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585> DOI: [10.1371/journal.pone.0172585](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585) PMID [28358806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28358806/) PMCID [PMC5373518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28358806/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28358806/)
  19. Kuo Y-Y, Jim W-T, Su L-C, Chung C-J, Lin C-Y, Huo C, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Is a Potential Therapeutic Agent for Oral Cancer. Int J Mol Sci [Internet]. 2015;16(5):10748-66. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/5/10748> DOI: [10.3390/ijms160510748](https://doi.org/10.3390/ijms160510748) PMID [25984601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25984601/) PMCID [PMC4463674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25984601/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25984601/)
  20. Rosseto HC, Toledo L de AS de, Francisco LMB de, Esposito E, Lim Y, Valacchi G, et al. Nanostructured lipid systems modified with waste material of propolis for wound healing: Design, in vitro and in vivo evaluation. Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]. 2017;158:441-52. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776517304423> DOI: [10.1016/j.colsurfb.2017.07.029](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.029) PMID [28728086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28728086/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28728086/)
  21. Mattigatti S, Ratnakar P, Moturi S, Varma S, Rairam S. Antimicrobial effect of conventional root canal medicaments vs propolis against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. J Contemp Dent Pract. mayo de 2012;13(3):305-9. DOI: [10.5005/jp-journals-10024-1142](https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1142) PMID [22918001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22918001/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22918001/)
  22. Clinical and Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S26. 26th Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI. Wayne PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
  23. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC Disk Test for Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases in Enterobacteriaceae Lacking Chromosomal AmpC  $\beta$ -Lactamases. J Clin Microbiol [Internet]. 1 de julio de 2005;43(7):3110 LP - 3113. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/43/7/3110.abstract> DOI: [10.1128/JCM.43.7.3110-3113.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3110-3113.2005) PMID [16000421](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16000421/) PMCID [PMC1169113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16000421/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16000421/)
  24. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient Test for Screening Metallo-B-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. J Clin Microbiol [Internet]. 1 de enero de 2000;38(1):40 LP - 43. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/38/1/40.abstract> DOI: [10.1128/JCM.38.1.40-43.2000](https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.40-43.2000) PMID [10618060](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10618060/) PMCID [PMC86013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10618060/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10618060/)
  25. Sierra R Cl, Guevara E, Guevara-Patiño A. Actividad in vitro de piperacilina-tazobactam en combinación con aminoglucósidos y fluoroquinolonas en *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo-B-lactamasas. Rev la Soc Venez Microbiol [Internet]. 2011;31(1):13-9. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562011000100004](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000100004) [SciELO Redalyc Lilacs](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25562011000100004/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25562011000100004/)
  26. Florián Christian, Alvarado Débora, Cocha Juana. Evaluación in vitro de la resistencia a ciprofloxacina en biopelículas y poblaciones planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario. An Fac Med [Internet]. 2006 Oct; 67(4):290-297. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-55832006000400003&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832006000400003&lng=es) [SciELO Redalyc Lilacs](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1025-55832006000400003/) [Google Académico](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1025-55832006000400003/)

27. Morales A, Lozano V. Introducción a la microscopía electrónica. Segunda Edición. Buenos Aires-Argentina. 1865; p. 45.
28. Pommerville J. Alcamo's fundamentals of Microbiology. 4th ed. New York. USA: Jones and Bartlett Publishers. 2010; p. 221.
29. Henríquez Ajenjo MC. Infecciones intrahospitalarias: conceptos actuales de prevención y control. Rev Chil Urol [Internet]. 2006;71(2):95-101. Disponible en: <http://www.enfermeriaaps.com/portal/download/INFECCION%20ASOCIADAS%20ATENCION%20EN%20SALUD/Infecciones%20intrahospitalarias.%20Conceptos%20actuales%20de%20prevencion%20y%20control.pdf> [Google Académico](#)
30. Poole K. Outer Membranes and Efflux: The Path to Multidrug Resistance in Gram-Negative Bacteria. Curr Pharm Biotechnol [Internet]. 2002;3(2):77-98. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/node/64245/article> DOI: [10.2174/1389201023378454](https://doi.org/10.2174/1389201023378454) PMID [12022261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12022261/) [Google Académico](#)
31. Ramyasmruthi S, Pallavi O, Pallavi S, Tilak K, Srividya S. Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from Solanaceae rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. Asian J Plant Sci Res [Internet]. 2012;3(6):1-9. Disponible en: [www.pelagiaresearchlibrary.com](http://www.pelagiaresearchlibrary.com) [Google Académico](#)
32. Arumugam K, Ramalingam P, Appu M. Isolation of *Trichoderma Viride* and *Pseudomonas Fluorescens* organism from soil and their treatment against rice pathogens. J Microbiol Biotech Res [Internet]. 2013;3(6):77-81. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Isolation-of-Trichoderma-Viride-and-Pseudomonas-and-Arumugam-Ramalingam/ae9dd46a71228fc232d1cf303b1ef4ebd372e3b0> [Google Académico](#)
33. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? Clin Microbiol Rev [Internet]. 1 de abril de 2005;18(2):306 LP - 325. Disponible en: <http://cmr.asm.org/content/18/2/306.abstract> DOI: [10.1128/CMR.18.2.306-325.2005](https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005) PMID [15831827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15831827/) PMCID [PMC1082798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1082798/) [Google Académico](#)
34. Rossolini GM. Acquired Metallo- $\beta$ -Lactamases: An Increasing Clinical Threat. Clin Infect Dis [Internet]. 1 de diciembre de 2005;41(11):1557-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1086/497839> DOI: [10.1086/497839](https://doi.org/10.1086/497839) PMID [16267726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16267726/) [Google Académico](#)
35. Sánchez G DI, Marcano Z D, Spadola C E, León G L V, Payares B DJ, Ugarte N CI, et al. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales en Venezuela. Rev del Inst Nac Hig Rafael Rangel. 2008;39(2):17-22. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-04772008000200004](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772008000200004) SciELO Lilacs [Google Académico](#)
36. Guevara A, de Waard J, Araque M. Detección del gen blaVIM-2 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo  $\beta$ -lactamasa aisladas en una unidad de cuidados intensivos en Ciudad Bolívar, Venezuela. Rev Chil infectología [Internet]. 2009;26(4):336-41. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182009000500005&lng=en&nrm=iso&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000500005&lng=en&nrm=iso&tlng=en) PMID [19802400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19802400/) SciELO Lilacs [Google Académico](#)
37. Černohorská L, Votava M. Antibiotic synergy against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*. Folia Microbiol (Praha) [Internet]. 2008;53(1):57. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0008-z> DOI: [10.1007/s12223-008-0008-z](https://doi.org/10.1007/s12223-008-0008-z) PMID [18481219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18481219/) [Google Académico](#)
38. Dunder D, Otkun M. In-Vitro Efficacy of Synergistic Antibiotic Combinations in Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. Yonsei Med J [Internet]. enero de 2010;51(1):111-6. Disponible en: <https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.1.111> DOI: [10.3349/ymj.2010.51.1.111](https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.1.111) PMID [20046523](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20046523/) PMCID [PMC2799966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2799966/) [Google Académico](#)
39. Balke B, Hogardt M, Schmoldt S, Hoy L, Weissbrodt H, Häussler S. Evaluation of the E test for the assessment of synergy of antibiotic combinations against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2006;25(1):25-30. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10096-005-0076-9> DOI: [10.1007/s10096-005-0076-9](https://doi.org/10.1007/s10096-005-0076-9) PMID [16402226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16402226/) [Google Académico](#)
40. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science [Internet]. 21 de mayo de 1999;284(5418):1318-22. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/284/5418/1318.abstract> DOI: [10.1126/science.284.5418.1318](https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318) PMID [10334980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10334980/) [Google Académico](#)
41. Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, et al. Antibiotic Susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Derived from Patients with Cystic Fibrosis under Aerobic, Anaerobic, and Biofilm Conditions. J Clin Microbiol [Internet]. 1 de octubre de 2005;43(10):5085-90. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/43/10/5085.abstract> DOI: [10.1128/JCM.43.10.5085-5090.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5085-5090.2005) PMID [16207967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16207967/) PMCID [PMC1248524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1248524/) [Google Académico](#)
42. López-Fabal F, Culebras E, Bonilla I, Gómez M, Picazo JJ. Actividad in vitro de terapia combinada con colistina frente a *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en unidad de cuidados intensivos. Rev Esp Quimioter [Internet]. septiembre de 2008;21(3):189-93. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/21/3/lopezfabal.pdf> PMID [18792821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18792821/) Dialnet [Google Académico](#)
43. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. J Clin Invest [Internet]. 1 de febrero de 2002;109(3):317-25. Disponible en: <https://doi.org/10.1172/JCI13870> DOI: [10.1172/JCI13870](https://doi.org/10.1172/JCI13870) PMID [11827991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11827991/) PMCID [PMC150856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC150856/) [Google Académico](#)
44. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature [Internet]. 2002;416(6882):740-3. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/416740a> DOI: [10.1038/416740a](https://doi.org/10.1038/416740a) PMID [11961556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11961556/) [Google Académico](#)
45. Davey ME, O'toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 1 de diciembre de 2000;64(4):847-67. Disponible en: <http://mmb.asm.org/content/64/4/847.abstract> DOI: [10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000](https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000) PMID [11104821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11104821/) PMCID [PMC99016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC99016/) [Google Académico](#)
46. Ochoa SA, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila LB, López-Martínez B, et al. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. Bol Med Hosp Infant Mex [Internet]. 2013;70(2):138-50. Disponible en: <https://www.mediagraphic.com/cgi->

<bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=41588> [SciELO](#) [Lilacs](#)  
[Google Académico](#)

47. Soto SM. Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Adv Biol* [Internet]. 2014;2014:543974. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2014/543974> DOI: [10.1155/2014/543974](https://doi.org/10.1155/2014/543974) [Google Académico](#)
48. Veloz JJ, Saavedra N, Lillo A, Alvear M, Barrientos L, Salazar LA. Antibiofilm Activity of Chilean Propolis on *Streptococcus mutans* Is Influenced by the Year of Collection. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:291351. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2015/291351> DOI: [10.1155/2015/291351](https://doi.org/10.1155/2015/291351) PMID [26247015](#) PMCID [PMC4515275](#) [Google Académico](#)
49. Campeau MEM, Patel R. Antibiofilm Activity of Manuka Honey in Combination with Antibiotics. *Int J Bacteriol* [Internet]. 2014;2014:795281. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2014/795281> DOI: [10.1155/2014/795281](https://doi.org/10.1155/2014/795281) PMID [26904740](#) PMCID [PMC4745454](#) [Google Académico](#)
50. Aissat S, Ahmed M, Djebli N. Propolis-Sahara honeys preparation exhibits antibacterial and anti-biofilm activity against bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Asian Pacific J Trop Dis* [Internet]. 2016;6(11):873-7. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2222180816611490> DOI: [10.1016/S2222-1808\(16\)61149-0](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61149-0) [Google Académico](#)
51. Bryan J, Redden P, Traba C. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 1 de febrero de 2016;62(2):192-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/lam.12532> DOI: [10.1111/lam.12532](https://doi.org/10.1111/lam.12532) PMID [26643709](#) [Google Académico](#)

#### Autores:

**Correspondencia:** Abadía-Patiño Lorena. <https://orcid.org/0000-0002-9154-4382>. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas. Departamento de Biomedicina. Departamento de Bioanálisis. Laboratorio de Resistencia Bacteriana. Cumaná-Sucre. Venezuela. Dirección Postal: Av. Universidad, cerro del medio. IIBCAUDO. Laboratorio de Resistencia Bacteriana. Telefax: 02934521297. E-mail: [biociencia2013@gmail.com](mailto:biociencia2013@gmail.com)

Bravo Rodríguez Carlos Enrique. <https://orcid.org/0000-0003-4268-3981>. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Departamento de Bioanálisis. Cumaná-Sucre. Venezuela. E-mail: [carlosbravo0991@gmail.com](mailto:carlosbravo0991@gmail.com)

Prin José Luis. <https://orcid.org/0000-0002-8784-274X>. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas. Departamento de Ciencias de los Materiales. Cumaná-Sucre. Venezuela. E-mail: [joseluis\\_prin@hotmail.com](mailto:joseluis_prin@hotmail.com)

Mosqueda Paraqueimo Saul José. <https://orcid.org/0000-0001-9535-4941>. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Departamento de Matemáticas. Cumaná-Sucre. Venezuela. E-mail: [sajomopa@gmail.com](mailto:sajomopa@gmail.com)

#### Contribución de los Autores:

**APL:** conceptualización, metodología, validación, recursos, redacción-preparación del borrador original, redacción-revisión y edición, visualización, supervisión, planificación y ejecución, administración de proyectos y adquisición de fondos. **BRCE:** investigación, curación de datos, redacción-preparación del borrador original y adquisición de fondos. **PJL:** metodología, validación, análisis formal, investigación y recursos. **MPSJ:** análisis formal, curación de datos y redacción-revisión y edición.