

## Expresión de porinas en *Pseudomonas aeruginosa* formando biocapas en sondas urinarias de látex siliconizado

**Sr. Editor:** *Pseudomonas aeruginosa* es una causa importante de infección del tracto urinario en pacientes sondados. Esta bacteria coloniza y produce biocapas en la superficie de las sondas urinarias. El biomaterial más frecuentemente usado en la fabricación de sondas urinarias es el látex siliconizado (SLS). En su manufactura se utilizan sales de cinc como aceleradoras del proceso de vulcanización. Estudios *in vitro* han demostrado que el cinc se libera (lixivia) de las SLS y determina una disminución de la actividad de los carbapenemes frente a bacterias planctónicas<sup>1,2</sup>. Este efecto se asocia a cambios en el perfil de proteínas de membrana externa del microorganismo (OMP), caracterizados fundamentalmente por la pérdida de OprD-2 y la expresión de OprD-3<sup>2</sup>. El cinc lixiviado también determina una sobreexpresión de la bomba de metales pesados CzsCBA<sup>3</sup>. La sobreexpresión de CzsCBA y la represión de OprD están mediadas simultáneamente por el regulador CzcR. Este fenómeno es reversible a las concentraciones de cinc que se alcanzan en los lixiviados de SLS ( $\approx 40$  mg/l). La exposición de *P. aeruginosa* a concentraciones 40 veces superiores a las alcanzadas en los lixiviados de SLS es capaz de seleccionar mutantes estables resistentes tanto a metales pesados como a carbapenems. Todos estos estudios se han realizado con bacterias planctónicas incubadas en lixiviados de sondas de látex o en caldo contenido diferentes concentraciones de cinc, pero se desconoce si este fenómeno se reproduce en bacterias sésiles localizadas en la superficie de SLS. El objetivo de este estudio ha sido determinar la relevancia de este fenómeno en biocapas de *P. aeruginosa* sobre SLS.

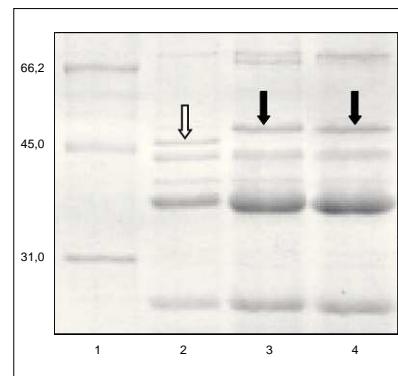
Las biocapas bacterianas se formaron mediante la incubación durante 24 h a 37 °C de 50 segmentos de 1 cm de SLS (2-way paediatric silicone coated latex Foley catéter 8FR/CH, Kendall CO, Malasia) en placas de Petri con 50 ml de caldo Müller-Hinton inoculado con  $5 \times 10^5$  UFC/ml de *P. aeruginosa* PAO1. Tras la incubación, todos los segmentos se lavaron cinco veces con tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, con objeto de eliminar las bacterias planctónicas y se traspasaron a tubos con 1 ml de tampón fosfato. Para desprendir las bacterias adheridas, los segmentos de SLS se sonicaron 2 min en un baño de ultrasonidos a 40 kHz. Tras la sonicación se elimi-

naron los segmentos y la suspensión bacteriana resultante se utilizó en posteriores experimentos.

Para conocer si el cinc se acumula en las biocapas bacterianas, la suspensión bacteriana resultante de despegar las biocapas fue autoclavada y la concentración de cinc se determinó mediante espectroscopia de emisión atómica en plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES). Como control se utilizaron segmentos de SLS sin biocapas procesados de la misma forma. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores de cinc alcanzados en las biocapas fueron de  $1,67 \pm 0,32$  µg/g de sonda, muy similares a los del control ( $1,88 \pm 0,27$  µg/g de sonda). Estos datos indican que aunque las concentraciones de cinc a las que se exponen las biocapas bacterianas son elevadas, éste no se concentra de manera especial en las mismas.

Para el estudio del perfil de OMP expresado en las biocapas, la suspensión bacteriana resultante de la disgregación de las biocapas fue sometida a sonicación para romper las células, y ultracentrifugación para obtener sus membranas. La purificación de OMP se realizó mediante tratamiento de las membranas con lauril sarcosinato y posterior ultracentrifugación y el perfil de OMP se determinó mediante SDS-PAGE con 10% (peso/vol) de acrilamida y 0,1% de bis-acrilamida (peso/vol) en el gel separador (fig. 1). El patrón de OMP expresado por las biocapas en SLS resultó idéntico al observado en bacterias planctónicas crecidas caldo de Müller-Hinton suplementado con cloruro de cinc (concentración de cinc en el medio: 40 mg/l), caracterizado por la pérdida una OMP compatible con OprD y la expresión de una nueva OMP de unos 50 kDa. La caracterización de la OMP desaparecida y de la nueva OMP expresada por las biocapas en SLS y por las bacterias crecidas en caldo de Müller-Hinton suplementado con cinc se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF tras digestión con tripsina de las bandas correspondientes del gel de SDS-PAGE<sup>2</sup>. El análisis comparativo de las secuencias inferidas con el genoma de PAO (PA2505; <http://pseudomonas.com>) permitió identificar la OMP desaparecida fue identificada como OprD-2 y la nueva OMP como OprD-3.

En conclusión, las bacterias que forman parte de biocapas de *P. aeruginosa* PAO1 en sondas urinarias de látex siliconizado no expresan OprD-2, porina responsable de la entrada de carbapenemes a esta bacteria. Como se observó en bacterias planctónicas, este fenómeno se debe a la presencia de altas concentraciones de cinc en la superficie del biomaterial.



**Figura 1.** SDS-PAGE de OMP expresadas por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. 1. Marcador de Pm. 2. Bacterias planctónicas en caldo de Müller-Hinton. 3. Bacterias planctónicas en caldo de Müller-Hinton suplementado con 40 mg/l de cinc. 4. Biocapas bacterianas sobre SLS. Flecha blanca: OprD2. Flecha negra: OprD3. Las OMP fueron identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF tras digestión con tripsina de las bandas correspondientes del gel de SDS-PAGE, y comparación de las secuencias inferidas con el genoma de PAO.

Parte de este estudio se presentó en el 15<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por la Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto SAF2003-01241).

*M. Carmen Conejo<sup>a</sup>, Isabel García<sup>a</sup>, Leandro Picabea<sup>b</sup> y Álvaro Pascual<sup>a</sup>*

Departamentos de <sup>a</sup>Microbiología

y de <sup>b</sup>Bioquímica, Bromatología,

Toxicología y Medicina Legal.

Facultad de Medicina. Universidad

de Sevilla. España.

### Bibliografía

- Martínez-Martínez L, Pascual A, Conejo MC, Picabea L, Perea EJ. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem induced by eluates from siliconized latex urinary catheters is related to outer membrane protein alterations. *Antimicrob Agents and Chemother*. 1999;43: 397-9.
- Conejo MC, García I, Martínez-Martínez L, Picabea L, Pascual A. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2003;47:2313-5.
- Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Kohler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2004;279:8761-8.