

24/78



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACION FENOTIPICA DE Pseudomonas
aeruginosa AISLADA DE PACIENTES CON
FIBROSIS QUISTICA**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
AMANDA FUENTES HUARTT

MEXICO, D. F.

1989

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

		Pág
CAPITULO I	RESUMEN	1
	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	
	1.1 GENERALIDADES DE <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	3
	1.2 ENFERMEDADES CAUSADAS POR <u>P. aeruginosa</u>	5
	1.3 INFECCIONES EN QUEMADURAS Y LESIONES	7
CAPITULO II	2.1 DEFINISION DE FIBROSIS QUISTICA	9
	2.2 PRINCIPALES MANIFESTIACIONES DE LA FQ	11
	2.2.1 RESPIRATORIO/CARDIOVASCULAR	11
	2.2.2 GASTROINTESTINAL	11
	2.2.3 SISTEMA REPRODUCTIVO	12
	2.2.4 ESQUELETO	13
	2.2.5 OTROS	13
	2.3 TRATAMIENTO DE PACIENTES CON FQ	14
CAPITULO III	3.1 DEFENSA DEL HUESPED CONTRA <u>P. aeruginosa</u>	15
	3.2 TERAPIA DE INFECCIONES POR <u>P. aeruginosa</u>	18
	3.3 PROFILAXIS	19
CAPITULO IV	DESARROLLO EXPERIMENTAL	20
	4.1 MATERIAL UTILIZADO	20
	4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO	20
	4.1.3 MEDIOS PARA DETERMINAR PERFIL ENZIMATICO	22
	4.1.4 MEDIOS EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	23
	4.1.5 DETERMINACION DE PATRONES PILOCINICOS	24
	4.1.6 CRISTALIZACION DE PROTEASAS	24
	4.2 MATERIAL Y METODO	25
	4.2.1 EXUDADO FARINGEO OBTENCION, PROCESAMIENTO Y AISLAMIENTO	25

4.2.2 IDENTIFICACION BIOQUIMICA	25	
4.2.3 DETERMINACION DE PERFIL ENZIMATICO	29	
4.2.4 DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICRO- BIANA	31	
4.2.5 DETERMINACION DE PATRONES PILOCINICOS	33	
4.2.6 CRECIMIENTO DE <u>P. aeruginosa</u> EN MEDIO SINTETICO	34	
CAPITULO V	RESULTADOS	37
CAPITULO VI	DISCUSION	46
CAPITULO VII	CONCLUSIONES	51
CAPITULO VIII	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	52

RESUMEN

Anteriormente, muchos géneros de bacterias fueron incluidas en la familia Pseudomonadaceae pero en la octava edición del Manual de clasificación de Bergey's el número de géneros fué reducido a 4.

Uno de los 4 géneros, el denominado Gluconobacter que antes estaba ubicado dentro de la familia Pseudomonadaceae se encuentra ahora en la familia Acetobacteraceae y su lugar fue ocupado por el género Frauteria.

La familia Pseudomonadaceae tiene características que permiten su identificación y que son las siguientes;

Son células en forma de bacilos rectos o ligeramente curvos, móviles, con flagelos polares, Gram-negativos y no esporulados.

La familia comprende 4 géneros que son: Pseudomonas, Xanthomonas, Frauteria y Zooglea.

El género de Pseudomonas se caracteriza por la habilidad que tiene de crecer en un medio simple de reacción neutra a expensas de una gran variedad de compuestos orgánicos. La reacción de oxidación es positiva. La morfología de Pseudomonas puede ser variante micóide, lisa, rugosa y semirugosa.

Los orígenes de las Xanthomonas aéreas son más delicadas que las Pseudomonas, se caracterizan por producir pigmentos celulares amarillentos y dan una débil reacción de oxidación negativa.

Las cepas de Pseudomonas y Xanthomonas aéreas no tienen tolerancia al ácido.

El género Frauteria puede desarrollarse a un pH 3.6.

El género Zooglea produce una masa viscosa, son adheridas a fases sólidas bajo condiciones naturales, no es patógena.

Se realizó un estudio bacteriológico sobre el agente patógeno Pseudomonas aeruginosa en la fibrosis quística para conocer sus características fenotípicas, determinar su capacidad para producir exoenzimas y caracterizar su patrón piocínico.

La producción y cristalización de proteasa se realizó, mediante el criterio de Morihara.

La identificación bioquímica de las colonias aisladas, se efectuó siguiendo los criterios comunmente usados en bacteriología diagnóstica y la sensibilidad antimicrobiana se llevó a cabo mediante la técnica de Kirby-Bauer.

De 20 pacientes diagnosticados con fibrosis quística, 10 tuvieron cepas de P. aeruginosa la cual se aisló, obteniéndose de sus características fenotípicas que el 100% estaba constituido por la variedad mucóide; el 100% de ellas produjo pigmentación y el 20% fluorescente lo que nos indica que probablemente se produjo fluorescencia.

En la producción de las exoenzimas se obtuvo que el 100% de producción de proteasa, colagenasa y lecitinasa, el 90% de elastasa y lipasa y el 80% y 40% respectivamente de hemolisina y ADNasa; únicamente se obtuvo el 10% de coagulasa.

También se determinó la frecuencia de resistencia de P. aeruginosa a los antimicrobianos, aislada de pacientes con fibrosis quística siguiendo la técnica de Kirby-Bauer a donde se observó que el 100% era resistente a Ampicilina, Nitrofurazona, Kanamicina, Cefalotina, y el 10% lo era a Cefsulodín-Sódico, siendo este último donde se observó menor resistencia para P. aeruginosa y muy sensible en este último de los casos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en consideración que un paciente con fibrosis quística es un sujeto inmunosuprimido (10), con alteraciones metabólicas y sometido de manera continua a tratamientos con antimicrobianos (14), es posible que la capacidad de P. aeruginosa aislada de estos enfermos tenga un amplio armamento enzimático, multiresistencia que coexista con la capacidad para evadir los mecanismos de protección propios de estos sujetos, como consecuencia de la selección a la que se encuentra sometida.

OBJETIVOS

- 1.- Conocer las características fenotípicas de P. aeruginosa aislada de pacientes con fibrosis quística.
 - 1a- Realizar aislamientos e identificación bioquímica de P. aeruginosa a partir de pacientes con fibrosis quística.
 - 1b- Determinar su capacidad para producir algunas exoenzimas involucradas en los mecanismos de patogenicidad.
 - 1c- Caracterizar el patrón bioclínico de estas cepas, y resistencia a antimicrobianos y otras propiedades que nos permitan determinar el fenotipo de P. aeruginosa aislada de pacientes con fibrosis quística.

1.1 GENERALIDADES DE Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa o bacilo del pus verde (Bacillus pyocyaneus), es un organismo de amplio potencial enzimático, productor de toxinas y polisacáridos de superficie involucrados en la capacidad para producir daño [27, 37, 39].

Su existencia fue advertida por Schroter en el año de 1872 [37], y se identifica como Pseudomonas más reportada en los anales de la microbiología médica. Muchos estudios se han llevado a cabo respecto de esta - peligrosa bacteria y de otras con características análogas (Cowell, 1964, 1965; Gilardi, 1972; Haynes, 1951; Hugh and Leifson, 1964; Jessen, 1965; - Lysenko, 1961; Atanier, Palleroni, and Doudoroff, 1966).

P. aeruginosa- Los organismos de esta especie son bacterias heterótrofas Gram-negativas en forma de bastones, de 0.5 a 1.0 por 3.0 a 4.0 μm ; poseen de 1 a 4 flagelos polares, además de presentar pili polar de 6 μm ; este es más delgado que el pili de las Enterobacterias; ambos actúan como receptores para varios fagos y son retráctiles. El pili polar retráctil tiene determinantes cromosómicos que puede movilizarse por plásmidos (Bradley, 1980) [37].

La secuencia de aminoácidos del pili es interesante pues parece haber sido conservada a través de la evolución, lo cual se comprueba con el hecho de que la secuencia amino-terminal de una proteína del pili de Pseudomonas aeruginosa, presenta homología alta con Neisseria meningitidis [5].

Estas bacterias no fermentadoras tienen la capacidad de producir un pigmento soluble en agua, llamado piocianina, sustancia que da la apariencia cromática azul-verdosa al área que rodea a la colonia o al crecimiento donde se establezca.

El metabolismo de P. aeruginosa es típicamente aeróbico, con -- oxígeno como el último aceptor terminal del electrón, pero muchas especies también pueden usar el nitrato como una alternativa del - aceptor del electrón (5).

La P. aeruginosa es un microorganismo extremadamente adaptable que puede integrar más de 80 compuestos orgánicos diferentes para su crecimiento; utiliza el nitrato y la arginina como aceptores de electrones, para crecer en forma anaeróbica (37). La temperatura - óptima para crecimiento de este microorganismo es de 35°C, pero -- puede crecer a 42°C.

Es baja en fitopatogenicidad, raramente ataca a las plantas - Esto solo sucede cuando éstas se encuentran bajo condiciones ambientales que le son adversas (37).

Esta bacteria es sumamente resistente y se multiplica con rapidez; sobrevive durante varios meses al medio que la rodea y se localiza frecuentemente en grifos de agua, estanques o desagües; generalmente se ubica en superficies húmedas o en líquidos aparentemente destilados (37).

Su reiterada permanencia es evidente pues aparece "hasta en el instrumental quirúrgico o en el equipo médico que después de haber sido utilizado, no fué sometido a un proceso correcto de esterilización" (Bruch 1971) (37).

Múltiples productos farmacéuticos elaborados con material crudo derivado de plantas tales como líquidos (Robinson 1971), crema de manos, cosméticos, ungüentos, supositorios, tabletas, pastas, emulsiones y jarabes (Kedzia 1977), tienden a dar origen a un medio adecuado a su desarrollo de P. aeruginosa (37).

P. aeruginosa forma parte en la flora intestinal, piel e intestino y es un patógeno provocando graves enfermedades; se aloja en las lesiones del tracto urinario, tracto respiratorio, bajo ciertas condiciones (3,9,30,31, 37).

Es un microorganismo oportunista que afecta a los pacientes con enfermedades metabólicas, hemáticas y malignas (30).

P. aeruginosa, además de presentar material genético contiene plásmidos (DNA de doble cadena), que tienen la característica de replicarse autónomamente y mantenerse en un estado extracromosomal. Estas tienen la habilidad de llevar a cabo procesos de conjugación (11,37).

1.2 ENFERMEDADES CAUSADAS POR LA P. aeruginosa.

Las estadísticas clínicas manifiestan que este bacilo, detectado, ha causado estragos en la humanidad debido a su resistencia, ubicuidad y proliferación.

Con tales características, P. aeruginosa avanza por medio de exoenzimas y exotoxinas originando enfermedades que atacan en forma directa, los tractos urinarios, respiratorios y gastrointestinal, lo que ocasiona enfermedades que se inician en la superficie epidérmica de los pacientes, o en las mucosas del oído y los ojos (30,31,32). P. aeruginosa llega a afectar también el cordón umbilical de los recién nacidos debido a malas medidas de asepsia y antisepsia (32). Dichas afecciones son la causa del deterioro en los tejidos del paciente enfermo y en la disminución de su resistencia personal (21,32).

En infecciones del tracto urinario, P. aeruginosa se instala en pacientes con obstrucción, quienes están sujetos a manipulaciones de la uretra (32).

TRACTO GASTROINTESTINAL

P. aeruginosa inicia su internamiento a través del tracto gastrointestinal por medio de infecciones simples, principalmente en aquellas que afectan a infantes prematuros o a menores con anomalías congénitas que, a la postre, terminan manifestando septicemia (32).

La otitis externa es otra de las enfermedades causadas por P. aeruginosa este padecimiento se inicia con una infección en la mucosa del oído y radica en la mastoide y en el seno paranasal. La otitis es más frecuente en climas tropicales, los pacientes presentan un cuadro crónico con drenaje de líquidos serosanguíneo o purulento hacia el conducto auditivo externo. Es notorio el desarrollo de esta enfermedad, especialmente en personas -- diabéticas (32).

El multireferido bacilo ataca al ojo mediante infecciones que es frecuente encontrar a manera de ulceraciones corneales que finalmente destruyen el globo ocular [5,16,32]. Una de las infecciones causada por P. aeruginosa es la conjuntivitis purulenta. Son causa de infecciones el uso de lentes de contacto y la contaminación.

1.3 INFECCIONES EN QUEMADURAS Y LESIONES

Las quemaduras y las heridas constituyen los accidentes más graves y frecuentes a los que se enfrenta la humanidad. Estos desafortunados hechos -- pueden tener serias consecuencias y requerir de un tratamiento difícil de llevar a cabo, para su cura y posterior restauración [1,15,18,32].

Las quemaduras abarcan una superficie corporal amplia, con los consiguientes problemas que conlleva, debido a las infecciones que se presentan entre la piel y el tejido subcutáneo. Es ahí, por tanto, donde se implanta P. aeruginosa penetrando las heridas y úlceras, en forma tal que pueden dar lugar a una dermatitis [1,3,9,18].

Bajo la costra de algunas quemaduras, se crea un infiltrado masivo de bacterias y de células inflamatorias, que comunmente sirve de foco para la invasión y finalmente la bacteremia. Esta ocurre en pacientes debilitados, en infantes prematuros, en pacientes con linfomas u otros tumores malignos, que genere un sujeto inmunosuprimido, siendo causa importante de muerte en pacientes con severas quemaduras [1,18,30].

La diseminación hematógica es caracterizada por abscesos hemorrágicos en muchas áreas, incluyendo la piel, corazón, pulmón, riñones y meninges (32).

INFECCIONES EN EL TRACTO RESPIRATORIO ENFATIZANDO LA FIBROSIS QUÍSTICA

La infección pulmonar esta asociada con microabscesos. P. aeruginosa frecuentemente se aísla del esputo de pacientes con bronquiectasis, bronquitis crónica o fibrosis quística (FQ) (16,17,35).

La bronquitis y la bronquiolitis son sucesos de la fibrosis quística, en los cuales es frecuente aislar las variantes mucoides de esta especie bacteriana (35).

CAPITULO 11

2.1 DEFINICION DE FIBROSIS QUISTICA

La FQ es una enfermedad multisistémica hereditaria de carácter autosómico recesivo caracterizada por anomalías en la función de las glándulas exócrinas (7,33,34,36).

Las principales características clínicas pueden explicarse con base en las secreciones más viscosas de las glándulas mucosas, por lo que se le llama mucoviscidosis, que lleva a la obstrucción del páncreas - (insuficiencias pancreática en el 80% de los pacientes) y a procesos pulmonares obstructivos, difusos crónicos que provocan infecciones (33).

En el 97% de los casos, el sudor de estos pacientes presenta incremento de 3 a 5 veces la concentración normal de sodio y cloro (33,34).

La FQ causa desajuste particularmente en aquellas personas que padecen trastornos de carácter hereditario (9,36).

Este padecimiento se identifica por la serie de irregularidades que genera, afectando las funciones glandulares exógenas del individuo.

Casi todos los que la padecen, desarrollan enfermedades progresivas y crónicas, ubicadas en el sistema respiratorio. Es ahí donde las afecciones pulmonares son causa de un preocupante índice de mortalidad y morbilidad (9,32,34).

La hipertensión pulmonar se desarrolla en pacientes con FQ con severa obstrucción aérea; los cambios pulmonares: la hipertrofia de glándulas bronquiales, seguido de un aumento de viscosidad del moco (20). Estas infecciones acarrear a la bronquiolitis y progresión centripeta de enfermedades endobronquiales que da como resultado la bronquitis crónica, la bronquiectasis e inflamación peribronquial (9,32,33,34,36).

La FQ es común entre las poblaciones de origen europeo. En un muestreo llevado a cabo se concluyó que la incidencia es proporcional a la penetración de genes caucásicos, ya que la enfermedad se presenta en uno de cada mil nacidos vivos blancos, mientras que en los negros americanos se detecta un caso por cada 17,000 habitantes, y en los hawaianos solo uno de noventa mil. Es notable la rareza de este padecimiento en la población negra africana. La incidencia del gene de la FQ en los blancos americanos es uno en veinte (32).

La mayoría de pacientes con FQ son diagnosticados en niños, pero algunos se escapan a la detección, y se captan siendo adultos.

2.2 PRINCIPALES MANIFESTACIONES DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

2.2.1 Respiratorio/Cardiovascular

- Bronquitis, Bronconeumonía, Bronquiectasia, Abscesos pulmonares, Aspergilosis.
- Atelectasia
- Sinusitis, polipos nasales
- Hipertensión Pulmonar
- Pneumotórax
- Insuficiencia Cardíaca
- Hemoptisis
- Insuficiencia respiratoria.

2.2.2 Gastrointestinal

A) Intestinal

- Ileoñ meconial
- Volvulus
- Atresia Ileal
- Impactación Fecal

- *Pneumatosis intestinal*
- *Invaginación*
- *Caída rectal*

B) *Pancreático*

- *Nutricional con reducción pancreática*
- *Esteatorrea*
- *Diabetes mellitus*
- *Pancreatitis recurrente*

C) *Hepatobiliar*

- *Atrofia en la vesícula biliar, Colelitiiasis*
- *Piedras de sales biliares*
- *Cirrosis biliar focal*
- *Hipertensión Portal*
- *Várices Esofágicas*
- *Hiperesplenismo*
- *Hemorroides*

2.2.3 Sistema Reproductivo

- *Varones: Esterilidad; los vasos deferentes, epididimo y vesículas seminales ausentes o defectuosos.*

- Mujeres: Fertilidad disminuida: incremento de viscosidad de secreción vaginal.

2.2.4 Esqueleto

- Retarda la madurez del hueso
- Desmineralización
- Osteoartropatía hipertrofica

2.2.5 Otros

- Disminución de Sales
- Dolor de Cabeza
- Hipertrofia de las glándulas salivales
- Hemorragia de la retina
- Hipertrofia de las glándulas apócrinas.

2.3 TRATAMIENTO DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

Los pacientes con bronquitis crónica se tratan con fisioterapia pulmonar y con un programa de ejercicios, lo que incrementa el mecanismo de drenaje.

El control de infecciones bacterianas o colonizaciones son manejadas con terapia específica de antibióticos para el organismo aislado en el esputo de pacientes con FQ. La resistencia de P. aeruginosa a antibióticos es frecuente en cepas aisladas de pacientes con enfermedad avanzada. En general se administran aminoglicósidos intravenosamente en combinación con penicilina modificada o cefalosporinas (14,35).

Los antibióticos en aerosol tienden a ser usados en el tratamiento (32).

El manejo del broncoespasmo de la infección se presenta en pacientes -- con FQ y el tratamiento es a través de broncodilatadores en aerosol. La pronta atención y terapia específica de complicaciones de enfermedades pulmonares tienden a ser factores importantes en la supervivencia del paciente -- con FQ (32).

Los casos de esclerosis pulmonar son tratados con agentes tales como la tetraciclina o quinacrina, o realizando pleurotomía.

CAPITULO III

3.1 DEFENSA DEL HUESPED CONTRA Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa. Las vacunas polivalentes pueden estimular el desarrollo de anticuerpos opsonizantes+, pero la utilidad médica en los enfermos con inmunosupresión y neutropenia, que son los que tienen mayor riesgo, no ha sido demostrada (10).

Opsonización; La función de las opsoninas del suero (GK.opsoni, preparar el alimento) es la de reaccionar con microorganismos y volverlos más susceptibles para su ingestión por los fagocitos. La virulencia de muchos agentes patógenos se relaciona en parte con su capacidad para evadir la fagocitosis en virtud de ciertos antígenos de superficie (10).

Los microorganismos en los cuales los factores superficiales antifagocitarios son de importancia, incluyendo Streptococcus pneumoniae y P. aeruginosa (polisacárido capsular) entre otros.

La opsonización de las bacterias puede ocurrir por cualquiera de los 3 mecanismos:

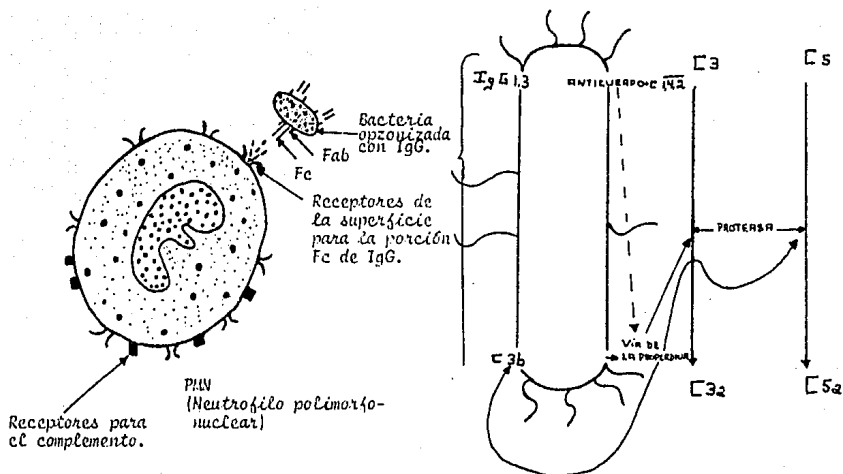
Primero, el anticuerpo específico por sí solo (subclase IgG1 e IgG3) puede actuar como opsonina, en abundancia de anticuerpos. Aquí, el anticuerpo anticapsular se combina con los polisacáridos antígenicos de la superficie

de P. aeruginosa a través de sitios de combinación del anticuerpo localizados sobre la porción Fab de esta molécula de inmunoglobulina. La porción Fc se adhiere a los sitios receptores sobre la superficie de los fagocitos, complementando en esta forma un puente entre las bacterias y el fagocito (10).

Segundo el anticuerpo específico, actuando junto con el complemento a través de la vía clásica C1, C4, C2 puede promover la opsonización microbiana. Aquí, una cantidad de anticuerpo, al parecer insuficiente para opsonizar por sí mismo, puede reaccionar con las bacterias y activar en sucesión progresiva la vía clásica del complemento. Los sitios receptores para C3 activado se encuentra sobre la superficie de los fagocitos (esquema 1). El C3 activado sobre la superficie de la bacteria sirve aparentemente como un puente entre la bacteria y el fagocito acelerando su ingestión (10).

Tercero, la opsonización puede ser inespecífica, a través de la vía alterna del complemento. Aunque el anticuerpo es requerido en forma absoluta para la actividad opsonica mediada por la vía clásica del complemento; la vía alterna no requiere de la reacción antígeno-anticuerpo. En su lugar, esta vía es activada directamente por polisacáridos bacterianos, micóticos, que resultan en la fijación de C3, el factor opsonico crucial, a la superficie del microorganismo, la ingestión por los fagocitos está medida por lo tanto, por el receptor celular para el C3 activado (10).

SISTEMA COMPLEMENTARIO



Representación esquemática sobre la superficie de un neutrófilo (PMN) que reacciona recíprocamente con los componentes del complemento y con la porción FC de las moléculas IgG.

3.2 TERAPIA DE INFECCIONES DE Pseudomonas aeruginosa

Las infecciones cutáneas causadas por P. aeruginosa pueden ser tratadas por irrigación con ácido acético al 1% o con antibióticos tópicos, entre los que se pueden usar el colistín y polimixina B (31,32,33).

La debridación y drenaje de material purulento, es esencial cuando el tejido profundo es afectado. Por mantenerse a profundidad la infección en el tejido, puede poner en peligro la vida del paciente causando infecciones tales como pneumonia o bacteremia (5,15).

Los aminoglicósidos; tobramicina y gentamicina inhiben el crecimiento de las cepas. En pacientes con función renal normal, se aplican dosis divididas de 5mg/Kg por día; con esto se suministran niveles inhibitorios. La amikacina es activa en contra de P. aeruginosa y es especialmente útil - contra cepas que tiene desarrollo enzimático y resistente a medicamentos como son la tobramicina y gentamicina. Esto tiene que ser suministrado en dosis de 15mg/Kg por día en dosis divididas. Ticarcilina y Mezlocilina son activas a dosis de 16 a 20 grms por día (14,32).

La piperacilina y la azlocilina son activos in vitro contra algunos aislamientos no inhibidos por ticarcilina. Estos aislamientos son de origen hospitalario. La combinación de un aminoglicósido activo contra Pseudomonas, además una penicilina antipseudomonadal es empleada frecuentemente, con el fin de retrasar la aparición de resistencia durante la terapia lo

que suministra y aumenta la actividad antimicrobiana especialmente en pacientes granulocitopenicos con infección de P. aeruginosa (36).

La susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomonas*, incluyendo a P. aeruginosa es variable y algunos de estos aislamientos tal vez resistan a aminoglicósidos (14,32).

Algunas cefalosporinas similar a cefaperazona son activas solo in vitro contra muchas cepas de *Pseudomonas* (32).

3.3 PROFILAXIS

Cuando son infecciones mixtas con *Pseudomonas* a nivel hospitalario, estas pueden ser reducidas con atención cuidadosa o técnicas asépticas y un buen control de la infección por medio de un sistema antibiótico profiláctico, tratando de prevenir la colonización e infección con P. aeruginosa (11,35).

CAPITULO IV

DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL UTILIZADO

1.- PROCEDENCIA DE LAS CEPAS ESTUDIADAS:

Se estudiaron pacientes con el diagnóstico clínico y de laboratorio de Fibrosis Quística procedentes del Instituto de Fibrosis Quística.

- a) Cepas Control: Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 y Staphylococcus aureus ATCC 25923 proporcionadas por Abbott laboratories de México S.A.

4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

- a) Medios para transporte: - Caldo Nutritivo de (Difco)
- b) Medios para Aislamiento:--Agar Mac Conkey (Merck)
- Pseudomonas Agar (difco)
 - Agar Base Sangre (Merck) complementada con el 5% de sangre de carnero desfibrinada.
 - Infusión Cerebro Corazón de (Difco) dializado-Agar de (Merck)-leche descremada.

c) Medios para Identificación Bioquímica:

- Base Oxidación Fermentación (BBL) más carbohidratos (Glucosa, Maltosa, y Xilosa).
- Base Descarboxilasa de Moeller: Arginina, Lisina y Ornitina. (Merck)
- Medio Citrato de Simmons (BBL)
- Medio Nitratos (Difco)
- Medio Kligler (Merck)
- Medio Urea de Cristensen (Merck)
- Medio STM (BBL)

d) Adiciones

- Carbohidratos: D (+) Glucosa, Maltosa (Merck)
D (+) Xilosa (Merck) a una concentración 10% para el medio OF basal.
Trealosa (Merck)
d- Manitol (Difco) a una concentración de 0.5% para la base caldo rojo fenol.

L- Aminoácidos al 1% para descarboxilasa base Moeller:

- Lisina
- Ornitina
- Arginina

e) Medios empleados para la preparación del inóculo

- Solución Salina isotónica al .85%
- Mac Farland del 10.5 al 0.1%
- BaCl_2 al 0.48M J.T. Baker (0.5ml)
- H_2SO_4 (Merck) al 0.36N (9.5ml)

4.1.3 MEDIOS PARA DETERMINAR PERFIL ENZIMATICO

- Medio para determinar la actividad de la Desoxirribonucleasa (DNAasa agar (BBL)).
- Medio para la determinación de Fibrinolisisina: Plasma citrato y CaCl_2 al 0.25%.
- Medio para la determinación de gelatinasa: Gelatina Nutritiva (Merck)
- Medio para observar la producción de hemolisina: Agar base sangre (Merck) complementada con sangre de carnero al 5%.
- Medio para observar la Lecitinasas: Agar Sangre (Merck), yema de huevo, solución salina Isotónica en proporción de 1 a 9.
- Medio para la determinación de Lipasa: Agar base sangre complementado con Tween 80.
- Medio para determinar la producción de proteasas: Leche descremada y Agar Bacteriológico (Bioxon).
- Medio para la producción de elastasa: Agar elastín (Sigma)
- Prueba de Oxidasa: Tetrametil para- β -enil-endiamino-hidrocarburo (Sigma) y agua destilada.

PRODUCCION DE PIGMENTO Y FLUORECENCIA

- Agar Centrífida (Difco)
- Infusión Cerebro Corazón dializado (Difco)
- Agar Leche descremada

4.1.4 MEDIOS EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

- Caldo de Mueller Hinton (Merck)
- Agar Mueller Hinton (Merck)
- Infusión Cerebro Corazón (BHT) 5 ml
- Mac Farland al 0.5% con solución salina isotónica.

- Antimicrobianos empleados:

	Por Disco	
* Acido nalidixico (Nx)	30 mcg	(Bigaux)
* Ampicilina (Ap)	10 mcg	(Bigaux)
* Carbencilina (Ca)	50 mcg	(Bigaux)
* Cefalotina (Cm)	30 mcg	(Bigaux)
* Clindamicina (Cli)	0.5 mcg	(Aboot)
* Cloranfenicol (Cl)	30 mcg	(Bigaux)
* Kanamicina (Km)	30 mcg	(Bigaux)
* Nitrofurasona (Ni)	300mcg	(Bigaux)
* Tetraciclina (Tc)	30 mcg	(Bigaux)

- Tinetoprín-Sulfametozazol (T/S)	25 mcg	(Bígaux)
- Eritromicina (E)	15 mcg	(Bígaux)
- Cefsulodin-Sódico (Cef)	30 mcg	(Difco)

4.1.5 DETERMINACION DE PATRONES

- Caldo Soya Tripticasa (Merck)
- Lámpara Minerali EHP modelo (R-51) W.H. Curtin & CO.
- 0.3 ml Cloroformo (J.T. Backer)
- 3 ml de Caldo Luria: Bacto Triptona (Difco) extracto de levadura (Difco) NaCl (J.T. Backer) Timina (Merck)
- Agar Nutritivo (Merck)
- Replicador de Steers

4.1.6 CRISTALIZACION DE PROTEASAS

- Glucosa (dextrosa)	7%	(Difco)
- $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	1%	(J.T. Backer)
- $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12\text{mol H}_2\text{O}$	0.5%	(J.T. Backer)
- Extracto de Levadura	2%	(Difco)
- CaCO_3	2.5%	(J.T. Backer)
- $\text{KH}_2 \text{PO}_4$	0.2%	(J.T. Backer)
- MgSO_4	0.05%	(Merck)

4.2 MATERIAL Y METODO

4.2.1 Exudado Faringeo, Obtención, procesamiento y aislamiento

Se eligieron para el presente estudio, niños con Fibrosis Quística clínicamente diagnosticados, a los cuales se les realizó exudado faríngeo en las condiciones indicadas por la literatura (32); empleando hisopo con algodón estéril y siendo esta muestra transportada en BHI (Infusión Cerebro Corazón) al laboratorio para su procesamiento, que consistió en la siembra en medios sólidos de agar Mac Conkey, agar Pseudomonas y agar base sangre complementada con sangre de carnero.

La siembra se realizó descargando el hisopo en los medios antes referidos y efectuando el estriado con asa bacteriológica con el fin de lograr el aislamiento colonial.

La incubación se llevó a cabo durante 18 a 24 hrs a 35-37°C de temperatura.

4.2.2 Identificación Bioquímica

La determinación bioquímica se efectuó posterior a la lectura de la morfología colonial, producción de pigmento y tinción de Gram, eligiendo una sola colonia a partir de la cual se sembraron diferentes tubos conteniendo los medios para la identificación bioquímica recomendado por la Asociación Americana en Microbiología.

La interpretación de cada una de estas pruebas se efectuó de acuerdo a los siguientes puntos:

a) Base Oxidación Fermentación (BBL) más carbohidratos (glucosa, maltosa y xilosa).

La prueba de oxidación-fermentación se efectúa para determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono. Específicamente en las pruebas efectuadas, esta bacteria tiene un proceso oxidativo.

Oxidación.

a) Producción de ácido

b) Base Descarboxilasa de Moeller (Merck): Arginina, Lisina y Ornitina.

Mide la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido y formar una amina con la consiguiente alcalinidad.

- Prueba positiva: Púrpura turbio a un Púrpura amarillento apagado (producido por la Cadaverina).

c) Agar Citrato de Simmons es de color verde ;

Prueba Positiva.- Viro de color azul intenso en el pico de flauta, esto nos indica si un organismo es capaz de utilizar el citrato como una fuente de carbono para su metabolismo, provocando alcalinidad.

d) Agar Kligler; Prueba Negativa.- No fermentación de glucosa ni de lactosa. En el pico de flauta, reacción alcalina color rojo.

e) Agar Nitratos (Disco); Prueba Positiva.- Determina la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o nitrógeno libre. Color rosado a rojo intenso.

Para determinar el género y especie de las cepas obtenidas se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes. Esto permitió considerar a P. aeruginosa de acuerdo a la siguiente tabla.

PRUEBA BIOQUÍMICA	REACCION	PORCENTAJE
Indol	-	0
Citrato de Simmons	+	
Sulfuro de hidrógeno H ₂ S	-	0
Ureasa	-	33
Gas de glucosa	-	0
Lactosa	-	0
Movilidad	+	97
Lisina	-	0
Arginina	+	99
Gelatina (22°C)	+	50
Xilosa	0	0
Glucosa	0	0
Nitratos	+	75

4.2.3 DETERMINACIÓN DE PERFIL ENZIMÁTICO

Empleando el método de estandarización del inóculo se tomaron 0.3ml de cada una dilución de 1×10^5 con lo cual obtuvimos aproximadamente 40 colonias en medio Agar leche descremada.

Estas colonias se inocularon en Agar DNAasa la cual fué incubada a 37°C durante 24 hrs, al término del cual se le añadieron unas gotas de ácido clorhídrico al 10%, produciéndose un halo de decoloración alrededor de las cepas positivas. (13).

Para la determinación de la Fibrinolisisina se emplearon 0.5 ml de plasma citratado al cual se le añadieron 5 gotas de CaCl_2 al 0.25%.

La mezcla fué incubada por 10 min a 37°C, lo que favoreció la formación de un coágulo. Una vez formado este, se añadieron 0.5 ml de un cultivo de toda la noche de las cepas a estudiar en BHI.

Después de un período de incubación por 18 hrs a 37°C, una prueba positiva permitió observar la destrucción del coágulo.

La determinación de hemolisinas se efectuó empleando el replicador de Steers como inculador múltiple de las cepas a estudiar en agar sangre y la incubación fué de 24 hrs a 37°C (13).

El mismo método se empleó para la determinación de Lecitinasa en medio de Agar Base Sangre complementada con yema de huevo y la deter-

minación de lipasa empleando el detergente Tween 80. El tiempo de incubación para estas dos pruebas fue hasta de 72 hrs a 37°C (13).

La determinación de la capacidad para producir elastasa, se efectuó en Agar elastina y el inóculo empleado fue depositado en pequeños pozos de 4mm de diámetro realizados en el medio. La incubación se efectuó a 35°C durante 24 a 72 hrs, manifestándose una prueba positiva por el aclaramiento del medio de cultivo alrededor del pozo (13).

La determinación de la colagenasa utilizando gelatina nutritiva en el tubo, se efectuó a través de la inoculación de este medio con 0.5 ml del cultivo de toda la noche e incubándose a temperatura ambiente (aproximadamente a 22°C) durante 5 días. Una prueba positiva se manifestó a través de la licuefacción del sustrato (13).

4.2.4 DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Las cepas a estudiar fueron inóculadas en 5 ml de Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubadas durante toda la noche a 35°C, ajustándose la turbidez a un Mac Farland 0.5% con el empleo de solución salina isotónica.

Este precipitado fue agitado e inculado en placas de petri conteniendo Agar Mueller Hinton recientemente preparado, empleando para ello, un hisopo de algodón previamente esterilizado distribuyéndolo uniformemente sobre la superficie (Esquema no. 2).

Los sensibilizadores que contenían antibióticos a probar fueron aplicados después de 3 a 5 min de haber inculado la bacteria con el fin de mantenerlas secas las cajas inculadas, estos unidiscos fueron distribuidos de tal manera que la lectura fuera adecuada.

Esta lectura se efectuó 18 hrs después de haber inculado las placas a 35°C.

La interpretación de la lectura se realizó midiendo el halo de inhibición de crecimiento, tomando como referencia las medidas sugeridas para cada uno de los antibióticos (14). Las cepas empleadas como referencia fueron Pseudomonas aeruginosa ATCC 27833 y Staphylococcus aureus ATCC 25923 (cepas control).

SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Pseudomonas aeruginosa

INOCULAR EN 5ml DE CALDO BHI
(INFUSION CEREBRO-CORAZON)



INCUBAR A 35°C DURANTE TODA
LA NOCHE



AJUSTAR LA TURBIDEZ CON EL
MAC FARLAND A 0.58



INOCULAR EN AGAR MUELLER
HINTON CON HISOPO ESTERIL
EN TODA LA SUPERFICIE.



COLOCAR LOS SENSIDISCOS
SOBRE EL AGAR.



INCUBAR DE 18-24 HRS. A 35°C



OBSERVAR RESULTADOS

4.2.5 DETERMINACION DE PATRONES PIOCINICOS

Los patrones piocinicos se determinaron en cultivos recientes de cada una de las cepas de P. aeruginosa; se inocularon en 7 ml de caldo soya tripticasa (Merck) y se incubaron durante 14 hrs a 32°C.

Posteriormente el cultivo fue vertido en cajas de Petri estériles y expuestos a la luz ultravioleta (lámpara Mineralight) modelo (R-51) durante 55 seg y vuelto a reincubar por 24 hrs a la misma temperatura. Pasado este tiempo se agregaron 0.5 ml de cloroformo [12].

El contenido se sometió a agitación durante 10 seg seguido de centrifugación a 1500 rpm durante 15 min; finalmente, se eliminó el cloroformo -- con una pipeta Pasteur y el sobrenadante se recolectó para su uso inmediato [12].

Las cepas indicadoras se cultivaron en 3ml de caldo Luria y son incubadas a 32°C durante 3 hrs [12].

La inoculación de los extractos piocinicos se realizó en agar nutritivo empleando el replicador de Steers y dejando secar a temperatura ambiente más tarde; las cepas indicadoras se sembraron por estrías cerradas y se incubaron durante 15 hrs a 32°C.

CRISTALIZACION DE PROTEASAS:

4.2.6 CRECIMIENTO DE P. aeruginosa EN MEDIO SINTETICO

Se cultivó la cepa en 100 ml de medio semisintético contenido en un frasco de 500 ml; se incubó en agitación (130 rpm a 28°C durante 4 días) y se centrifugó el caldo a 5000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente se separó el sobrenadante para trabajarlo, llevándolo a una saturación de 0.6 gr/ml con NH_4SO_4 sólido y se colocó durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

El precipitado formado en este caso (cristales) fue disuelto en -- agua desionizada (10 ml) y se almacenó a una temperatura de 4°C. Del sobrenadante restante se hizo otra centrifugación a 5000 rpm durante 20 minutos por segunda vez, obteniéndose una porción clara.

Para detectar la actividad proteolítica se tomó una pequeña porción del residuo del primer sobrenadante y se sembró en agar leche, observándose el halo de degradación de la caseína. Se hizo una segunda extracción con 10 ml de agua desionizada y el residuo que quedó, se centrifugó (27).

El extracto fue combinado con el sobrenadante inicial. A esta com-

binación clara se le añadió sulfato de amonio a una saturación de 0.6 g/ml. Después de una noche, el precipitado (cristales), se colectó por centrifugación y se disolvió en agua desionizada (10 ml). Se conjuntaron el primero y segundo precipitado en agua desionizada, después se les añadió acetona a 4°C a la solución, hasta que la dilución llegó a 65% (27).

Se recolectó el precipitado (cristales) por centrifugación 5000 rpm durante 20 minutos y se disolvió en buffer de fosfatos a 0.02M a un pH 8.0 y esto se dializó contra el mismo amortiguador por 2 días a una temperatura de 4°C. Esto fue probado en placas conteniendo Agar Leche descremada para probar su actividad proteolíticas (4,8,27).

DIAGRAMA DE CRISTALIZACION DE PROTEASAS

PACIENTES CON FIBROSIS
QUISTICA

TOMA DE EXUDADOS Y TRANS-
PORTE EN EHI

AISLAMIENTO DE COLONIAS
CON ASA BACTERIOLOGICA
SIEMBRA DEL INOCULO EN

MEDIOS SOLIDOS:

AGAR Mac CONKEY

AGAR PSEUDOMONAS

AGAR BASE SANGRE

↓
INCUBACION DURANTE 15-24 hrs

A 35-37°C

↓
DETERMINACION DE MORFO-
LOGIA COLONIAL, PRODUC-
CION DE PIGMENTOS, TIN-
CION DE GRAM.

↓
IDENTIFICACION BIOQUIMICA
SIGUIENDO LOS CRITERIOS
COMUNMENTE UTILIZADOS EN
BACTERIOLOGIA DIAGNOSTICADA.

↓
PERFIL ENZIMATICO

↓
SENSIBILIDAD ANTIMICRO-
BIANA SIGUIENDO LA TEC-
NICA DE KIRBY-BAUER

↓
DETERMINACION
DE
PATRONES

↓
CRISTALIZACION DE
PROTEASAS.

C A P I T U L O V

RESULTADOS

Para conocer e identificar plenamente las características fenotípicas de las Pseudomonas aeruginosa y específicamente aquellas aisladas en menores con diagnóstico de fibrosis quística, se realizaron 20 exudados faríngeos. De las 20 muestras, únicamente 10 exudados presentaron el agente que motiva la presente investigación.

Las cepas localizadas en los exudados de cada uno de los 10 infantes fueron aisladas y se encontró la siguiente morfología:

- a) El 100% estaba constituido por colonias mucoides
- b) El 100% produjo pigmento
- c) El 20% mostró fluorescencia .

(tabla no. 1)

Las pruebas realizadas in vitro para determinar la capacidad de producción de exoenzimas relacionadas con la patogenicidad de las cepas indicaron que la producción de exoenzimas por las cepas estudiadas fue muy alta. Se observó también que todas las cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística tenían la capacidad para producir:

MORFOLOGIA COLONIAL DE CEPAS DE Pseudomonas aeruginosa
AISLADAS DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE FIBROSIS QUISTICA

COLONIAS MUCOIDES	100%
PRODUCCION DE PIGMENTO	100%
PRODUCCION DE FLUORESCETINA	20%

TABLA No. 1

PRODUCCION DE EXOENZIMAS POR Pseudomonas aeruginosa AISLADAS
DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE FIBROSIS QUISTICA

EXOENZIMAS	F	%
PROTEASA	10	100
COLAGENASA	10	100
LECTINASA	10	100
ELASTASA	9	90
LIPASA	9	90
HEMOLISTINA	8	80
ADNasa	4	40
COAGULASA	0	0

F= frecuencia

- a) 100% de proteasa, colagenasa y lecitinasa
- b) 90% de elastasa y lipasa
- c) 80% de hemolisina
- d) 40% de ADNasa

De las cepas tomadas para la prueba de exoenzimas, únicamente el 10% produjo coagulasa.

(tabla no. 2)

De la investigación realizada en materia de la cristalización de exoenzimas, se desprende lo siguiente:

Que la cristalización de exoenzimas se obtuvo siguiendo el método de Morihara, se llevó a cabo a través de un medio sintético (fig no 3,1).

Se confirmó también la actividad proteolítica (in vitro) de los cristales, empleando el sustrato agar-leche descremada, se observó en su entorno un "halo" blanquecino, originado por la degradación de caseína (fig no. 2). Se detectó también otro "halo" blanquecino (más pequeño) cuando en el experimento se utilizó agar elastina (fig no. 1).

En la prueba de sensibilidad, se determinó el patrón de resistencia frente a los siguientes 12 antimicrobianos.

ACTIVIDAD ELASTOLITICA

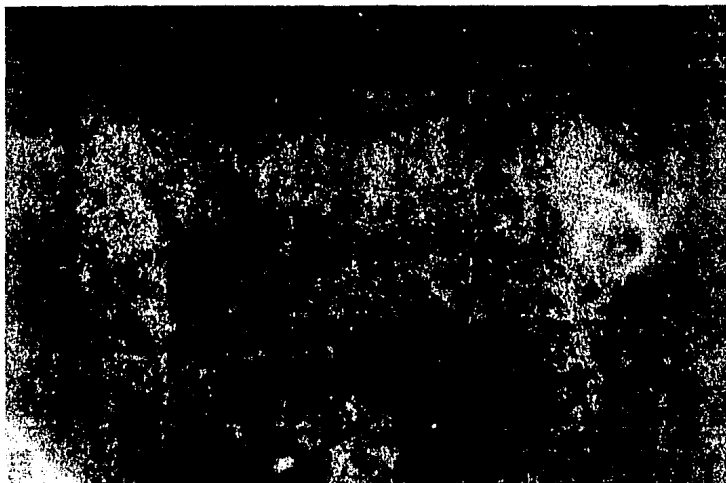


Fig. no. 1

ACTIVIDAD PROTEOLITICA
SOBRE CASEINA

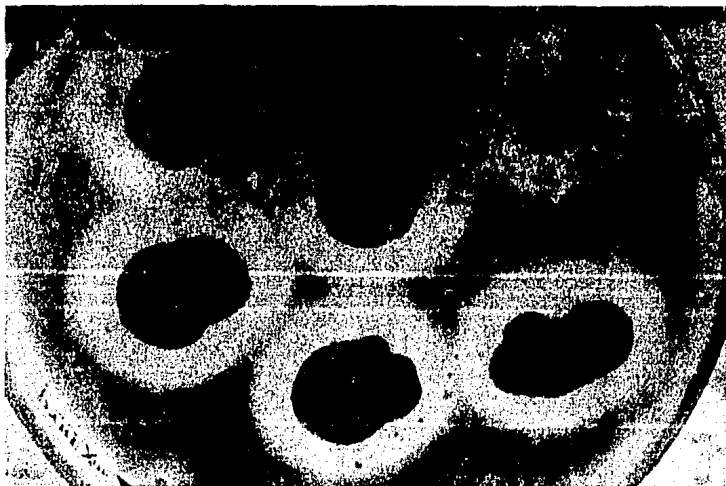


Fig. no. 2

PRODUCTO INTERMEDIO DE CRISTALIZACION
DE
PROTEASAS DE Pseudomonas aeruginosa.



Fig. no. 3

PRODUCTO FINAL DE LA CRISTALIZACIÓN DE
PRÓTEASAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

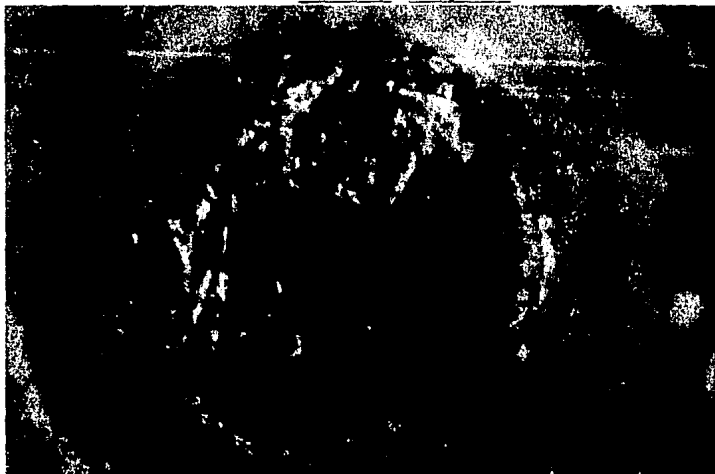


Fig. no. 4

EFECCIÓN *in vitro* DE LOS CRISTALES DE
PRÓTEASAS DE *Pseudomonas aeruginosa*



Fig. no. 5

Ampicilina (Ap), Nitrofurazona (Nf), Kanamicina (Km), Cefalosporina (Ce), Clindamicina (Cli), Tetraciclina (Tc), Eritromicina (E), Trimetoprim-sulfametoxazol (T/S), Carbencilina (Ca), Acido nalidixico (Nx), Cefsulodin-Sódico (Cef), Cefalotina (Cm). Sin embargo el 100% de las cepas de P. aeruginosa fue resistente a la ampicilina, nitrofurazona, Kanamicina, cefalotina y clindamicina, el 90% a la tetraciclina, eritromicina; trimetoprim-sulfametaxazol. El menor porcentaje de resistencia ocurrió para carbencilina 40%, Acido nalidixico 20% y cefsulodin-sódico 10% (tabla no. 3).

FRECUENCIA DE RESISTENCIA DE P. aeruginosa
A LOS ANTIMICROBIANOS
AISLADA DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

ANTIMICROBIANOS	FRECUENCIA	POR CIENTO
AMPICILINA	10	100%
NITROFURAZONA	10	100%
KANAMICINA	10	100%
CEFALOTINA	10	100%
CLINDAMICINA	10	100%
TETRACICLINA	9	90%
ERITROMICINA	9	90%
TRIMETOPRIM/SULFA METOXAZOL	9	90%
CARBENCILINA	4	40%
ACIDO NALIDIXICO	2	20%
CEFSULODIN-SODICO	1	10%

Cepas de Referencia

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 26923

Determinación por la Técnica de Kirby-Bauer

En resumen:

Las características fenotípicas de las 10 cepas de P. aeruginosa aisladas de pacientes con fibrosis quística, mostraron una morfología mucóide.

El 100% de las cepas produjeron proteasa, colagenasa y lecitinas; el 90% elastasa y lipasa, el 80% y 40% respectivamente hemolisina y ADNasa. Solo el 10% produjo únicamente coagulasa.

El patrón de resistencia a los antibióticos indica que el 100% de las cepas fue resistente a; ampicilina, kanamicina, clindamicina, cefalotina y cloranfenicol.

El 90% lo fue para trimetoprim-sulfametoxazol, eritromicina y tetraciclina.

El 40% para Carbencilina y el 20% para el Acido nalidíxico.

De todos los antibióticos probados el de menor porcentaje de resistencia fue el Cefsulodin-Sódico, siendo más sensible la cepa para este último que fue de un 10% (tabla no. 4).

La máxima frecuencia correspondió al tipo piocínico 33 (20%) y el subtipo piocínico F (42.85%) y V (35.7) (tabla no. 5).

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE *P. aeruginosa* AISLADAS
DE PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA

CEPA	MORFOLOGIA COLONIAL	PROTEASA	LECITINASA	COLAGENASA	ELASTASA	LIPASA	HEMOLISTINA	ADNasa	COAGULASA	PATRON DE RESISTENCIA
1	M	+	+	+	+	+	+	+	-	Ap, Ca, Cef, CLi, Cm, Km, Ni, Nx, Fe, T/S.
2	H	+	+	+	+	+	+	-	-	Ap, Ce, CLi, Cm, E, Km, Ni, Te, T/S.
3	M	+	+	+	-	+	-	-	-	Ap, Ce, CLi, Cm, E, Km, Ni, Fe.
4	M	+	+	+	+	+	+	-	-	Ap, Ce, CLi, Cm, E, Km, Ni, Te, T/S.
5	M	+	+	+	+	+	+	+	+	Ap, Ce, CLi, Cm, E, Km, Ni, Te, T/S.
6	M	+	+	+	+	-	+	+	-	Ap, Ca, Ce, CLi, Cm, E, Km, Ni, Nx, T/S.
7	M	+	+	+	+	+	+	+	-	Ap, Ce, CLi, Cm, E, Km, Ni, Te, T/S.
8	M	+	+	+	+	+	+	-	-	Ap, Ca, CLi, Cm, E, Km, Ni, Te, T/S.
9	M	+	+	+	+	+	+	-	-	Ap, CL, CLi, Cm, E, Km, Ni, Te, T/S.
10	M	+	+	+	+	+	-	-	-	Ap, Ca, Ce, CLi, Cm, E, Km, Ni, Te, T/S.

M= Mucóide

Tabla no. 4

PATRONES PIOCINICOS MAS FRECUENTEMENTE ENCONTRADOS EN
PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA

TIPOS PIOCINICOS	POR CIENTO	SUBTIPOS PIOCINICOS	POR CIENTO
33	20%	F	42.85%
6	10%	V	35.7%
31	10%	L	7.1%
54	10%	O	7.1%
72	10%	ND	7.3%
75	10%		
82	10%		
84	10%		
103	10%		

ND= No determinadas

D I S C U S I O N

En este estudio se determinaron las características fenotípicas de cepas de P. aeruginosa aisladas de pacientes con fibrosis quística, ya que ésta es considerada una enfermedad frecuente en menores de edad, es hereditaria y llega a causar la muerte por insuficiencia respiratoria. Los pacientes con fibrosis quística, generalmente presentan una historia prolongada de bronquitis purulenta misma que conduce a la destrucción de bronquiolos, así como otras áreas del aparato respiratorio (36).

Por lo general, en este tipo de pacientes, P. aeruginosa ha sido el principal microorganismo aislado (19,20,23,24) a partir de aspirados bronquiales y espectoraciones, como se puso de manifiesto en el presente trabajo, en donde el 50% de los pacientes presentaron aislamientos positivos, con un predominio de la variedad mucóide, que es encontrada frecuentemente en pacientes con fibrosis quística (tabla no. 1).

H.V. Reynolds y col. señalan que:

..." Las personas atacadas por la enfermedad denominada fibrosis quística, son personas propensas para adquirir infecciones crónicas por medio de las *Pseudomonas*, toda vez que estas pertenecen a un grupo especial, con susceptibilidad suficiente para colonizar las formas mucóides de este organismo" (35).

Los hallazgos tanto clínicos como patológicos en estos pacientes, sugieren una destrucción progresiva de proteínas estructurales a consecuencia del potencial del que es portador P. aeruginosa, entre las que se encuentran una serie de exoenzimas con actividad proteolítica, las que capacitan a la bacteria a evadir los mecanismos de defensa e invadir distintos tejidos, fenómeno reportado en 1949, por Baló y col., quienes descubrieron una enzima dentro del tejido pancreático cuya característica primordial la constituye el elevado contenido de elastasa hidrolizada (27).

Kazuyuki Morihara afirma en su Specific Cleavage of Human Type III y IV Collagens by Pseudomonas aeruginosa Elastasa.

..."Los estudios histológicos realizados en tejidos infectados por P. aeruginosa, evidencian una necrosis exageradamente extendida, así como la formación de microabsesos con el deterioro consiguiente causado en los segmentos vasculares, seguido de pronunciadas hemorragias" (16).

El análisis de producción de exoenzimas de las cepas aisladas de los pacientes estudiados, demostraron que el 100% de ellas son capaces de producir proteasa in vitro, con actividad sobre la caseína y -colágena, esta última considerada el principal componente estructural del tejido conectivo (16).

Por otra parte, las cepas estudiadas fueron capaces de degradar la elastina en un 90%. Por lo antes referido, podemos considerar que por

La acción de estas exoenzimas en pacientes con fibrosis quística portadores de estas cepas, la colagena de sus tejidos se puede encontrar afectando no sólo por la actividad de colagenasa elaborada por la bacteria aislada, sino que además la colagena puede ser degradada aunque en menor intensidad por otras proteasas entre las que se encuentra la elastasa (90% de frecuencia) y las proteasas con actividad sobre la caseína. En el presente trabajo no se determinó si era proteasa alcalina; sin embargo pudimos poner de manifiesto, a través de su efecto sobre la caseína y la cristalización de la exoenzima igual probada in vitro, datos que concuerdan con lo reportado por Döring y colaboradores (2,27).

El efecto del resto de las exoenzimas (lecitinasa producida en el 100%, lipasa en el 90% y hemolisinas en el 80%), ha sido ampliamente discutido y se ha planteado que actúa sobre componentes de membrana celular de los pacientes portadores de estas bacterias (tabla no. 2) (6).

Analizando los datos de exoenzimas identificadas en cepas de P. aeruginosa provenientes de pacientes ambulatorios y de quemados, podemos establecer que, aún cuando en los anteriores estas exoenzimas se presentan, la frecuencia de producción no es uniforme entre las cepas de distintos orígenes. Hay una alta producción en el grupo de pacientes con fibrosis quística con respecto a los otros (27).

Una característica de P. aeruginosa es la alta frecuencia de resis-

tencia a agentes antimicrobianos y a iones de metales pesados (mercurio, cromo, plata, magnesio, manganeso y litio) como consecuencia de la presión selectiva a la que se ven sometidos. Harold y col. mencionan ... "que la P. aeruginosa es resistente a los agentes antimicrobianos por lo cual es un fenómeno muy complejo. La resistencia de este organismo es una combinación de la poca entrada de antibiótico con la acción de las exoenzimas que inactivan o modifican al antibiótico". En el caso de las infecciones locales, como en quemaduras de 3er grado, tiene gran importancia en el tratamiento del quemado [14].

El patrón de resistencia encontrado en las cepas de los pacientes estudiados, no fue la excepción, se observó una multiresistencia a los agentes antimicrobianos empleados en la determinación, los cuales corresponden a aquellos de uso común, y alta sensibilidad en aquellos de reciente introducción. La explicación a esto se encuentra, en el hecho de que se trata de pacientes crónicos con terapia prolongada (tabla no. 3).

Finalmente, podemos considerar que el patrón bioquímico presentado en este tipo de pacientes es variable como consecuencia de la ubicuidad de esta bacteria. Por lo tanto es difícil considerar que se encuentren infectados por la misma cepa, ya que su origen es diverso y por lo tanto, es razonable un patrón diferente..

Los resultados de los patrones bioquímicos de las 10 cepas estudiadas, (salvo el tipo 6 ya encontrado por los autores en pacientes quemados), en ningún momento corresponden a patrones repetitivos localizados a nivel nacional e internacional [12].

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

No podemos decir lo mismo para los subtipos F V de los patrones pirocánicos los cuales frecuentemente se encuentran en estudios epidemiológicos realizados durante brotes epidérmicos por P. aeruginosa en unidades de quemados, de neonatos y terapia intensiva.

Respecto a los tipos, podemos pensar que los datos encontrados se deben al diferente origen de los pacientes, ya que provienen de diferentes sitios de la república mexicana. Por tratarse de pacientes comprometidos, serían colonizados por P. aeruginosa de la región que habitan.

CONCLUSIONES

- 1.- Fenotípicamente la morfología de las bacterias aisladas más frecuentemente localizada, fue la denominada "variedad mucóide".
- 2.- El alto índice de producción de exoenzimas generadas por las cepas obtenidas sugiere que esas proteínas pueden ser consideradas como un factor de virulencia en la patogenicidad de la enfermedad.
- 3.- El método de Morihara facilitó la obtención in vitro de exoenzimas que a la postre, se cristalizaron confirmando su actividad proteolítica.
- 4.- Las cepas estudiadas presentan características propias de la especie, tales como su armamento enzimático y su alta frecuencia de resistencia a agentes antimicrobianos. Esto puede ser consecuencia de la presión selectiva a la que se ven sometidos.
- 5.- El patrón pioclinico presentado en este tipo de pacientes es versátil como consecuencia probablemente de la omnipresencia de esta bacteria. Sería difícil considerar que los pacientes se encuentran infectados por la misma cepa, ya que su origen geográfico es diferente y se espera un patrón distinto.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Carney, S.A., Dyster., and Jones R.J. (1973).
The Invasion of Burned Skin by Pseudomonas aeruginosa.
B.J. Dermatol. 88 pp 539-545.
- 2.- Döring, G., Dalhoff, A., Vogel, O., Brunner, H., Dröge, U., and
Botzenhart, K. (1984). In vivo activity of Proteases in Pseudomonas
aeruginosa in rat model.
J. Infect. Dis. 149 pp 532-537.
- 3.- Döring, G., Goldstein, W., Roll, A., Olu, S.P., Hoiby, N. and Botzen-
hart, K., (1985). Role of Pseudomonas aeruginosa exoenzymes in lung
Infections of patients with cystic fibrosis.
Infect. Immen. 49(3) pp 557-562.
- 4.- Döring, G., Obernesser, H.J., Botzenhart, K., Fleming, B., Hoiby, N.
and Hofmann, A. (1983). Proteases of Pseudomonas aeruginosa in
Patients with Cystic Fibrosis.
J. Infect Dis. 147(4) pp 744-750.
- 5.- Doudoroff, M., and Palleroni, N.J., In Buchanan, R.E. Gibbons, N.E.
(eds). (1974). Manual Bergey's of Determinative Bacteriology. 8th
(ed). Baltimore, Williams and Wilkins. pp 143-150.
- 6.- Dulbeco, R., Davis, D., Ginsberg, S., Harold; et al (1973).
Mecanismos de patogenicidad de Pseudomonas aeruginosa productor de
productos extracelulares. Microbiología 2a edición, editorial
Harper International. pp 240-247.
- 7.- B., Ericsson, H., Annika, Granstrom, M., Vasil, M.L., Wretling, B.,
Stranavik. (1982). Prospective study of serum antibodies to Pseu-
domonas aeruginosa, exoproteins in cystic fibrosis.
J. CLI. Microbiol. 25 pp 1860-1874.

- 8.- Elsheikh, L.E., Bergman, R., Cryz, S.J. and Wretling, B., (1986).
A. Comparison of Different Methods for determining elastase activity of Pseudomonas aeruginosa strains from Mink.
Acta path. Microbiol. Immun. scand. sect B 94 pp 135-138.
- 9.- Fick, R.B., Baltimore R.S. Jr., Squier U.S., and Reynolds, H.V. (1985).
IgG Proteolytic Activity of Pseudomonas aeruginosa in cistic fibrosis.
J. Infect. Dis. 151(4) pp 589-598.
- 10.- Fundenberg, H.H., Cadwell, L.J., Stites, D.P., Wells U.J. (1982).
Inmunología clínica 3a edición editorial Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. pp 29-36, 263-264 y 732.
- 11.- Goodman, L. and Gilman A. (1978). Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 5a edición, editorial Interamericana. México, D.F. pp 915-930.
- 12.- Govan, J.R.W. (1973) capítulo 3 Pyocin Typing of Pseudomonas aeruginosa Department of Bactiology Medical school University of Edinburgh, Edinburgh Scotland. 10 pp 61-85.
- 13.- Handa, J.M., Sheehan, D.J., and Botton, E.J. (1982). Recovery of Pseudomonas aeruginosa colonial Dissociants on A Protease detection medium. J. Clin. Microbiol. 15 pp 178-180.
- 14.- Harold C.C., Neu, M.D. (1984). Mecanismos of Resistance to antimicrobial agents in microorganisms causing infection in the patient at risk for infection. Amer. J. Med. pp 11-23.
- 15.- Heck L., Morihara K., and Dale P. (1986). Degradation of soluble laminin and depletion of tissue-associated basement membrane laminin by Pseudomonas aeruginosa elastase and alkaline protease.
Infect. Immun. 54(1) pp 149-153.

- 16.- Heck, L.W., Morihara, K., Mc Rae, W.B., and Miller, E.J. (1986). Specific cleavage of human type III and IV collagens by Pseudomonas elastase. Infect. Immun. 51 pp 115-118.
- 17.- Higley, S.T., Hastie, A., Kueppers, F. and Higgins, M.L. (1986). Disruption of respiratory cilia by Proteases including those of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 54(2) pp 379-385.
- 18.- Hoiby, N. (1982) Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. Acta Paediatr. Scand. Suppl 301 pp 33-54.
- 19.- Hoiby, N. (1974). Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis, relationship between mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa and humoral immune response. Acta Pathol. Microbiol. Scand. sect. B. 82 pp 551-558.
- 20.- Hoiby, N. (1980). Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis Acta. Pathol. Microbiol. scand 262 (1) pp 96-98.
- 21.- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. (1980) Exotoxins produced by aerobic Gram-negative enteric bacteria Pseudomonas aeruginosa exotoxin. Review of Medical. Microbiology E. 14a. edición, editorial Lange Medical Publications. pp 142-155.
- 22.- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., (1979). Manual de Microbiología Médica, 8a edición, editorial Manual Moderno. México. pp 229-230.
- 23.- Laraya-Cussay, L.R., Cundy K.R., and Hung, N.N. (1976). Pseudomonas carrier rates of patients with cystic fibrosis and of members of their families. J. Pediatr. 89 pp 23-26.

- 24.- Luzar, M.A., Thomassen, M.J., and Hotie, T.C. (1985). Flagella and Motility Alterations in Pseudomonas aeruginosa strains from patients with cystic fibrosis: Relationship to patients clinical condition. *Infect. Immun.* 50 (2) pp 577-582.
- 25.- Morihara, K. (1964). Production of Elastase and proteinase by Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.* 88 (3) pp 745-757.
- 26.- Morihara, K., and Homma, Y. (1986). New Method of Preparing elastase toxoid from Pseudomonas aeruginosa. *J. Infect. Dis.* 152 (4) pp 716-721.
- 27.- Morihara, K., Tsuzuki, H., Oka, T., Inove, H., Ebata, M. (1965). Pseudomonas aeruginosa elastase isolation crystallization, and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.* 240(8) pp 3295-3304.
- 28.- Nicas, T.I., Badley, J., Lochner, J.E., Iglewski, B.H. (1985). Role of Exoenzyme "S" in infections with Pseudomonas aeruginosa. *J. Infect. Dis.* 152(4) pp 716-721.
- 29.- Nichols, W.W. et al (1986). Derepressed beta-lactamase synthesis in strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (4). pp 453-458.
- 30.- Pedersen, B.K., and Kharazmi, A. (1987). Inhibition of Human Natural Killer Cell activity by Pseudomonas aeruginosa alkaline protease and elastase. *Infect. Immun.* 55(4) pp 986-989.
- 31.- Pedersen, S.S., Espersen, F., and Hoiby, N. (1987). Diagnosis of chronic Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 25(10) pp 1830-1836.

- 52.- Petersdorf, R.G., Adams, R.D., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Martin, J.B., Wilson, J.D. (1987) Principles of Internal Medicine.
Mc Graw-Hill. International Book Company. eleven edition, New York.
pp 950-954.
- 33.- Petersdorf, R.G., Adams, R.D., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Martin J.B., Wilson, J.D. (1983). Principles of Internal Medicine.
Mc Graw-Hill. International book Company. tenth edition, New York.
pp 876-877.
- 34.- Petersdorf, R.G., Adams, R.D. Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Martin J.B., Wilson, J.D. (1980). Principles of Internal Medicine.
Mc Graw-Hill. International book Company ninth edition, New York.
pp 884-886.
- 35.- Reynolds, H.V., and Fick, R.B. (1975). Pseudomonas aeruginosa
pulmonary infections (emphasizing nosocomial pneumonia and respi-
ratory infections in cystic fibrosis). Amer. J. Med. pp 58(2) pp 71-88.
- 36.- Suter, S., Schaad, U.B. Roux, L., Nydegger, Urs-E., and Waldvogel, F.A.
(1984). Granulocyte Neutral Proteases and Pseudomonas Elastase as
Possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis.
J. Infect. Dis. 149 (4) pp 523-531.
- 37.- Star, M.P., Stolp, H., Trauer H.G., Balowsa and Schlegel, H.G. (ED).
(1986). The Prokaryotes: A Handbook on Habitats isolation and
Identification of bacteria. Springer Verlag Berlin. I. pp 655-683
y 701-706.
- 38.- Stuer, W., Jaeger, K.E.? and Winkler, U.K. (1986). Purification of
Extracellular lipase from Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol.
168(3) pp 1070-1074.

- 39.- Thalia, I., and Iglewski, B. (1986). Production of elastase and other exoproducts by environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa J. Clin. Microbiol. 23 pp 967-969.
- 40.- Thomassen M.J. (1985). Pseudomonas aeruginosa isolates comparison's of isolates from campers and from sibling pairs with cistic fibrosis *Pediatr. Pulmonol.* 1 (1) pp 40-45.
- 41.- Valdecasas, F.G., Laporte, J., Salva, J.A., Cuenca, E., Esplugues, J., Bartolome, M., Forn, F., Jane, Brugger, A., Erill, S., Rodriguez, L. (1978). Bases Farmacológicas de la Terapéutica Medicamentosa. Salvat editores pp 98-99.
- 42.- Williams, Burdon (1980) Microbiología. 5a edición editorial Publicaciones Cultural, S.A. México, D.F. pp 447-448.
- 43.- Zinsser (1983). Microbiología. 17a edición, editorial Panamericana. México. pp 714-719.