

2 Ej. No. 28

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**ESTUDIO DE EXOENZIMAS RELACIONADAS CON LA
PATOGENICIDAD Y SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS
EN CEPAS DE Pseudomonas aeruginosa**

T E S I S

**Para obtener el Título de
QUIMICO - FARMACEUTICO - BIOLOGO**

P r e s e n t a

MONICA DIAZ OSUNA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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 EINTRODUCCION (1)1.- GENERALIDADES

- A) Características del género Pseudomonas. (4)
- B) Pseudomonas aeruginosa y su importancia clínica. (8)
- C) Aislamiento e identificación de Pseudomonas aeruginosa. (11)
- D) Tipificación. (14)
- E) Variación morfológica en Pseudomonas aeruginosa. (15)
 - F, 1.- Factor fitotóxico. (18)
 - F, 2.- Pigmentos. (19)
 - F, 3.- Acido cianhídrico. (19)
 - F, 4.- Enzimas proteolíticas. (20)
 - F, 5.- Sustancias hemolíticas. (23)
 - F, 6.- Exotoxinas. (24)
 - F, 7.- Enterotoxinas. (25)
 - F, 8.- Cubierta superficial. (26)
 - F, 9.- Producción y patogenicidad. (26)
- G) Susceptibilidad a antimicrobianos. (28)

II.- PARTE EXPERIMENTAL.

A) Material	(36)
1.- Cepas utilizadas.	(36)
2.- Medios utilizados.	(36)
3.- Adiciones.	(37)
4.- Antimicrobianos.	(38)
5.- Reactivos.	(38)
6.- Amortiguadores.	(39)
7.- Material de vidrio.	(39)
8.- Equipo.	(40)
B) Método.	(41)
1.- Aislamiento y caracterización.	(42)
2.- Tinciones.	(42)
3.- Caracterización bioquímica.	(42)
4.- Observación de movilidad y confirmación de pureza.	(43)
5.- Diluciones y selección de colonias.	(44)
6.- Morfología colonial.	(44)
7.- Producción de exoenzimas y pigmentos.	(44)
8.- Producción de las diferentes fracciones de proteasa.	(45)
9.- Determinación de susceptibilidad a antimicrobianos.	(45)

III.- RESULTADOS.

- A) Características de la morfología colonial. (48)
- B) Diámetros coloniales. (53)
- C) Exoenzimas relacionadas con la patogenicidad. (55)
- D) Producción de diferentes fracciones de proteasa. (57)
- E) Pigmentos: Fluoresceína y pio-cianina. (59)
- F) Susceptibilidad a antimicrobia-nos. (61)

IV.- DISCUSION DE RESULTADOS. (72)**V.- CONCLUSIONES.** (79)**BIBLIOGRAFIA.** (82)

INTRODUCCION:

Los miembros del género Pseudomonas presentan diversidad bioquímica, lo que les confiere una gran capacidad de ataque a un enorme número de compuestos orgánicos (10). Pseudomonas aeruginosa es uno de los pocos patógenos para el humano que puede atacar, además, a gran variedad de huéspedes, tales como animales, insectos e incluso plantas (10).

En los últimos años la importancia clínica de Pseudomonas aeruginosa, como patógeno responsable de una gama de enfermedades en el humano, se ha incrementado dramáticamente. Dicho incremento ha resultado de la resistencia que presenta este microorganismo a la mayoría de los agentes antimicrobianos (especialmente en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+}), hecho que se observa sobre todo desde la aparición de antimicrobianos de amplio especto y su uso indiscriminado (38). Debido a esta resistencia, Pseudomonas aeruginosa adquiere prevalencia e importancia cuando las bacterias susceptibles de la flora normal son eliminadas, convirtiéndose, por lo tanto, en principal patógeno.

Un hecho relevante en la patogénesis de esta bacteria es el aumento en la incidencia de las enfermedades nosocomiales en individuos comprometidos, tales como aquellos que han tenido un tratamiento prolongado con agentes inmunosupresores, corticosteroides, antibióticos o con radiaciones.

Pseudomonas aeruginosa se encuentra como una de las principales causas de muerte en pacientes con quemaduras; se le puede encontrar como causante de severas diarreas epidémicas en niños (33); en infecciones oculares ocasionan la rápida pérdida del ojo; se conocen casos de meningitis (por contaminación de agujas para punción lumbar); en septicemia da origen a un síndrome semejante al choque producido por endotoxinas de microorganismos Gram negativos; son comunes las otitis medias y las infecciones urinarias causadas por este microorganismo. Cuando se instala en una sala de hospital es difícil de erradicar, ya que es capaz de desarrollar en soluciones antisépticas (33, 38).

Pseudomonas aeruginosa produce una variedad de toxinas y enzimas extracelulares, algunas de las cuales contribuyen en su patogénesis, así como varios tipos de pigmentos, tales como la fluoresceína y la plocianina. Esta última es de especial importancia debido a que posee cierta actividad antimicrobiana (10, 33). Por otra parte, este microorganismo presenta una estructura colonial inestable, encontrándose colonias que pueden ser rugosas, lisas o mucoides (33), que contribuyen a su versatilidad fenotípica.

En el presente trabajo se realizará un estudio de algunas de las exoenzimas relacionadas con la patogenicidad, pigmentos, aspecto morfológico y pruebas de susceptibilidad a diversos antimicrobianos de cepas de Pseu-

domonas aeruginosa aisladas a partir de exudados de pacientes hospitalizados que presentaron quemaduras de segundo y tercer grado y de medio ambiente extrahospitalario. Este estudio pretenderá establecer de qué manera se están presentando actualmente dichas características en diferentes cepas y asimismo observar si el lugar de aislamiento presenta alguna influencia sobre estas características.

1.- GENERALIDADES:

A) CARACTERISTICAS DEL GENERO Pseudomonas.

Los microorganismos pertenecientes al género Pseudomonas son bacterias que se hallan libres en la naturaleza y se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, agua, aguas negras y en el aire (6, 13, 31). Poseen, en general, las siguientes propiedades fenotípicas:

Son bacilos unicelulares, Gram-negativos, no esporulados, rectos o en ocasiones ligeramente curvos; miden de 0.5 a 1 μm de ancho, por 1.5 a 4 μm de largo. Las especies móviles poseen uno o varios flagelos polares; sin embargo, en medios sólidos se ha reportado movilidad por contracción en algunas cepas no flageladas de Pseudomonas aeruginosa (6, 10).

Utilizan los carbohidratos, oxidándolos con la consecuente producción de ácido, más no de gas, es decir, su metabolismo es respiratorio, pero nunca fermentativo o fotosintético (1). Son aerobios estrictos, siendo el oxígeno molecular el aceptor universal de hidrógeno. Sin embargo, crecen bajo condiciones anaerobias en presencia de nitrato y arginina, usando estos sustratos como aceptores de electrones, por lo que se les encuentra como uno de los participantes más activos en los procesos de mineralización de la materia orgánica en la naturaleza (10, 13).

Todas las especies de este género son catalasa positivas y dan reacciones negativas para indol, rojo de metilo y acetilmetilcarbinol. Con algunas excepciones, las especies

de este género son fuertemente positivas para la indofenol-oxidasa.

Pseudomonas no son exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales, ya que son capaces de desarrollarse en una gran variedad de medios de cultivo. Muchas especies crecen en medio mínimo, sin la presencia de factores de crecimiento, conteniendo solamente amonio como única fuente de carbono y energía. Sólo pocas especies requieren aminoácidos y vitaminas como factores de crecimiento (18).

Algunas especies producen ácidos a partir de la oxidación de alcoholes y aldosas, especialmente cuando éstos se encuentran en altas concentraciones. Pueden acumular poli- β -hidroxibutirato como reserva intracelular de carbono, particularmente bajo condiciones de privación de nitrógeno (6, 10).

La temperatura óptima de crecimiento de este género de microorganismos varía considerablemente, ya que va desde 4° hasta 43°C, pero para la mayoría de las especies la temperatura óptima se encuentra alrededor de los 30°C.

Todas las especies pueden crecer bien en un pH neutro o alcalino (7.0 - 8.5), pero muchas son incapaces de crecer a pH de 6.0 o menor.

Algunas especies requieren 1.0% de Na Cl como requerimiento osmótico o bien como requerimiento específico de sodio para su crecimiento.

La producción de pigmentos es una propiedad característica de ciertas especies y variedades y pueden ser de varios tipos, como las pteridinas, hidrosolubles y fluo-

centes, pudiéndoseles observar en gran variedad de medios de cultivo, pero particularmente en aquellos con bajo contenido de fierro y las fenazinas, conocidas como plocianinas, de color azul, rojo, amarillo o verde, que son sintetizadas por la vfa de los aminoácidos aromáticos. Los pigmentos carotenoides pueden ser producidos al menos por cuatro especies bien características: Pseudomonas vesicularis, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas flava, Pseudomonas pailleronii, siendo responsables del color amarillo o naranja de las colonias de estos microorganismos (10).

Las características mínimas necesarias para la identificación de las especies del género Pseudomonas se resumen en la siguiente tabla (33):

Característica:	Signo:
Gram-negativo, recto o ligeramente curvo	+
No esporulado	+
Flagelo polar mono o pluritricus	+
Movilidad	Usualmente +
O F glucosa medio abierto ácido	+ o -
O F glucosa medio cerrado ácido	-
Glucosa gas	-
Indofenol-oxidasa	+ o -
Catalasa	+
Pigmentos fotosintéticos	-
Indol, rojo de metilo, acetil metil carbinol	-

Las especies de este género contienen de 58 a 70% moles de Guanina - Citosina en el ADN.

Algunas cepas de especies características, en número muy reducido, pueden ser hospederos de bacteriófagos (6).

La transferencia genética por transducción se ha mostrado en Pseudomonas aeruginosa y en Pseudomonas putida. En la primera también se puede observar conjugación (6).

Este género de microorganismos incluye agentes etiológicos de importantes enfermedades de plantas y animales (10).

De las muchas especies de Pseudomonas aisladas de material clínico humano, sólo tres (Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas pseudomallei y Pseudomonas mallei) se asocian usualmente con enfermedades en el hombre.

El incremento de padecimientos oportunistas en donde frecuentemente se encuentra a miembros del género Pseudomonas, ha despertado gran interés, tanto médico como genético, por el estudio del papel de estos microorganismos como patógenos en el humano y como posible fuente de recursos (10, 18).

B) Pseudomonas aeruginosa Y SU IMPORTANCIA CLINICA.

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo que puede desarrollarse tanto en hábitat exógenos como endógenos. Aunque se ha aislado frecuentemente a partir de diversas lesiones en el humano, su papel en las enfermedades humanas se consideró durante mucho tiempo insignificante, ya que raramente ataca a individuos normales inmunológicamente (10,13,15).

Pseudomonas aeruginosa es esencialmente un patógeno débil, pero su capacidad para sobrevivir y crecer bajo condiciones adversas para la mayoría de las especies patógenas le confiere características de un oportunista (10).

Igualmente, la capacidad para desarrollarse bien a la temperatura del cuerpo y de poseer varios factores tóxicos, tales como la producción de una variedad de toxinas, enzimas y pigmentos, algunos de los cuales indudablemente contribuyen a la patogenicidad, le confieren a esta bacteria ventaja sobre muchos otros oportunistas (10).

Por otra parte, los factores de predisposición del huésped, como edad, quemaduras, tratamientos prolongados con antimicrobianos de amplio espectro e inmunosupresores, son extremadamente importantes en el desarrollo de las enfermedades causadas por este microorganismo.

A las diversas enfermedades causadas por Pseudomonas aeruginosa se les puede dividir en:

- 1) Locales. En heridas de piel (especialmente en quemaduras y úlceras ectimatosas), en tracto urinario (cistitis, pielonefritis), en tracto respiratorio (fibrosis quística, bronconeumonía), en ojo (conjuntivitis necrosante), en oído (otitis externa, pericondritis) y en aparato digestivo (diarreas, principalmente en neonatos).
- 2) Generalizadas. Como la septicemia, en la que la bacteria es acarreada por el torrente sanguíneo y se origina a partir de una enfermedad primaria local (10).

Se le puede encontrar también causando meningitis (por contaminación en el equipo de punción lumbar) y endocarditis como consecuencia de la septicemia.

En animales, los cambios patológicos son similares a los que se observan en enfermedades invasoras en el humano y pueden producirse por la inoculación de cultivos de Pseudomonas aeruginosa, lo que representa una herramienta útil para su estudio (10). Se ha observado que la LD₅₀, al inocular ratones por vía intraperitoneal con un cultivo fresco de Pseudomonas aeruginosa (con aproximadamente 7×10^8 bacterias), causa la muerte por septicemia del 70 al 80% de los animales.

El tratamiento de las enfermedades causadas por

este microorganismo es difícil y, por lo tanto, la mortalidad muy elevada (en la septicemia puede ser superior al 80%) (13); además de ser un microorganismo bien conocido como un frecuente contaminante de equipo de hospital (v.g. respiradores, humidificadores, etc.) y de algunas soluciones antisépticas, así como su elevada resistencia a diversos agentes antimicrobianos, hace de suma importancia el desarrollo de métodos efectivos de profilaxis, en donde el estudio inmunológico de Pseudomonas aeruginosa juega un papel importante en el desarrollo de sueros y vacunas (10, 15, 24).

C) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Pseudomonas aeruginosa.

A Pseudomonas aeruginosa se le puede aislar frecuentemente del suelo y del agua, en contraste con el humano sano, en donde sólo se encuentra en el conducto intestinal del 10% de los individuos y en forma esporádica en las zonas húmedas de la piel y en la saliva (13).

Pseudomonas aeruginosa son bacilos Gram-negativos que miden de 0.5 a 0.8 μm de ancho, por 1.5 a 3.0 μm de largo. Se les encuentra solos, en pares o formando cadenas cortas. Su contenido de guanina-citosina en el ADN es de 67% moles. Son móviles por uno o varios flagelos polares (6). Sin embargo, la movilidad por contracción en la superficie de medios sólidos se ha reportado en cepas no flageladas (9, 10).

Pseudomonas aeruginosa crece con facilidad en los medios de cultivo comunes, a temperaturas de 37°C hasta 42°C, no pudiendo desarrollarse a 4°C (6, 13). No fermenta ningún carbohidrato, forma generalmente colonias redondas, lisas, de color verdoso fluorescente y de olor característico (tortilla húmeda), que corresponde a un compuesto identificado como 2-aminoacetofenona (11). Algunas de las cepas poseen actividad hemolítica tipo β (13).

Las características mínimas para poder identificar a Pseudomonas aeruginosa se resumen en la tabla siguiente:

Característica:	Signo:	% Positividad:
Flagelo polar mono o pluriftricos (3 flagelos como máximo por polo)	+	96
Movilidad	+	96
O F glucosa en medio abierto	+	97
O F maltosa medio ácido	-	4
Indofenol oxidasa	+	100
L-Lisina descarboxilasa	-	0
Ac. Sulfhídrico (en Agar-Hierro-Kligler)	-	0
Crecimiento a 42°C	+	100

Muchas de las cepas de Pseudomonas aeruginosa producen una fenacina, llamada comunmente piocianina, pigmento de color azul-verde, soluble en agua y cloroformo y que posee cierta actividad antimicrobiana. Asimismo, otras cepas de la misma especie pueden sintetizar además otros pigmentos como pioverdina o fluoresceína (amarillo verdoso y fluorescente), piourubina (rojizo) y piomelanina (café o negro hidrosoluble), aunque menos del 3% de cepas clínicas aisladas son productoras de este último (2, 10, 13).

La observación de fluorescencia bajo irradiación ultravioleta es un criterio muy usual en la detección de Pseudomonas aeruginosa. La producción de fluoresceína puede incrementarse añadiendo al medio de cultivo 0.03% de cetrimida, lo que facilitará el aislamiento a partir de muestras clínicas (10).

En lo que se refiere a la producción de piocianina es recomendable el uso de Agar Tech, ya que es un medio muy efectivo, simple y barato (47).

D) TIPIFICACION.

El incremento en la importancia de las enfermedades debidas a Pseudomonas aeruginosa ha exigido que en muchos hospitales se realice la diferenciación de cepas, a fin de llegar a establecer las fuentes y mecanismos de transmisión de un microorganismo aislado de un brote epidémico (3, 10).

Los métodos más usados para la tipificación de cepas son los siguientes:

Determinación de serotipos, sensibilidad a antimicrobianos y tipos piocianogénicos (3).

La tipificación por fagos de Pseudomonas aeruginosa es una herramienta usual en la subclasificación o clasificación más fina de cepas aisladas de pacientes (que no es posible lograr por medio de los serotipos) (34).

Ningún método por sí solo puede darnos tanta información como la que se puede obtener por combinación de al menos dos de ellos (10).

E) VARIACION MORFOLOGICA EN Pseudomonas aeruginosa.

Se ha reportado una gran variación morfológica en cepas de Pseudomonas aeruginosa: colonias lisas, rugosas, mucoides, gelatinosas, enanas, etc. y es común aislar una o más de estas variedades de un mismo paciente (54).

Un aspecto importante en la variación fenotípica de las colonias de Pseudomonas aeruginosa es el hecho de que estos microorganismos sufren disociación (8). Este fenómeno ocurre tanto in vivo como in vitro, aunque no es propiedad de todas las cepas, ni de aquellas aisladas del torrente sanguíneo (27, 57).

En las cepas disociantes existe estabilidad de reacciones; en cambio, hay diferencia en la pigmentación (en intensidad y tono), en los tipos serológicos y en los patrones de tipificación por fagos. Se ha detectado también que no existen grandes diferencias entre las colonias de las cepas disociantes de una misma cepa original (54, 57).

Se ha observado que, después de la exposición a bacteriófagos, algunas cepas de Pseudomonas aeruginosa presentan conversión morfológica colonial en donde el cambio más sorprendente es la transformación de colonias no-mucoides a mucoides (parece depender de la iniciación del ciclo lítico), así como la conversión de cepas iridiscientes (brillo metálico) a cepas que no lo son (40, 57).

Es común observar que en cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de pacientes, la variación es espon-

tánea in vitro de la forma colonial mucoide a la no-mucoide. La asociación particular de colonias mucoides con enfermedades del tracto respiratorio y especialmente común en fibrosis quística, evidencia que el cambio de forma de no mucoide a mucoide puede ocurrir en el cuerpo humano. Además, Dogget y sus colaboradores (1966) observaron que las formas no mucoides siempre preceden a las mucoides, que ocasionan daños más extensos en el paciente y sugieren, por tanto, que las variantes mucoides sean naturalmente seleccionadas (40, 54). In vitro, las cepas mucoides son extremadamente inestables de acuerdo con la composición del medio que juega un papel muy importante; recientemente se demostró que es posible aumentar la estabilidad de estas cepas cultivándolas en agar citrato-de-soxicolato (21).

Otro factor que influye en el aspecto de las colonias de Pseudomonas aeruginosa es la presencia de pilis polar, ya que éste confiere movilidad por arrastre, lo que provoca que las colonias se observen extendidas, rugosas y con bordes irregulares, mientras que las mutantes sin pilis no forman este tipo de colonias, sino que son lisas, mucho más pequeñas y con bordes regulares (9).

Los antibióticos también afectan la morfología de la bacteria y podemos mencionar el caso de los β -lactámicos, ya que algunas bacterias presentan ciertas pro-

telas (indispensables para la forma, elongación o simplemente necesarias para la bacteria misma) con afinidad para ligarse covalentemente al C14, de la benzil-penicilina, unión que da como resultado diversos daños, como por ejemplo:

- Formación de esferoplastos, seguido de la rápida lisis.
- Generación de formas esféricas osmóticamente estables.
- Inhibición de la división celular, causando la filamentación de la bacteria (12).

Entre los cambios más frecuentemente causados por antibióticos podemos también citar la formación de cadenas, perforaciones en la superficie, elongación, extremos redondeados y formas estreptocócicas (55).

La variación morfológica tiene, entre otras, dos importantes consecuencias:

Primera, características en la pigmentación, la cual puede ser afectada por la disociación, que no es particularmente deseable como marcador genético; y
segunda, las cepas disociantes muestran susceptibilidad en la tipificación por fagos, lo que crea dificultades para estudios epidemiológicos y de transducción (27).

F) EXOENZIMAS RELACIONADAS CON LA PATOGENICIDAD Y OTROS FACTORES TOXICOS.

En los últimos años se ha demostrado que las enzimas extracelulares, exotoxinas y algunos de los metabolitos secundarios de estas sustancias producidas por Pseudomonas aeruginosa, tienen una importante relación con la virulencia y son altamente tóxicos (25, 28, 36). A continuación se expondrán los diversos daños, formas de actuar y características de las principales exoenzimas y productos extracelulares relacionados con la patogenicidad de este microorganismo:

F, 1.- Factor fitotóxico.

Pseudomonas aeruginosa se reconoce como un patógeno de vegetales que puede causar lesiones necróticas en las hojas de la planta del tabaco y lechuga, ya que posee un factor fitotóxico que parece ser análogo al de Pseudomonas tabaci. La estructura de este factor es similar a la metionina, excepto porque la molécula de sulfuro de este aminoácido está reemplazada por un carbono y funciona como un metabolito análogo a la metionina, bloqueando su metabolismo. En el caso de Pseudomonas aeruginosa, este factor no ha sido completamente caracterizado hasta el momento. Sin embargo, la naturaleza del factor fitotóxico parece ser no tóxico para los tejidos animales (36).

F, 2.- Pigmentos.

Es bien conocido que Pseudomonas aeruginosa produce varios pigmentos entre los cuales tenemos a la piocianina (derivado de la fenacina), la que ha demostrado poseer efectos tóxicos sobre esferoplastos, células epiteliales y cultivos de tejidos. Inyecciones de este pigmento en animales no causan aparentemente daños significativos. Esta sustancia actúa además como antibiótico (bacteriocina) contra otras cepas de la misma especie u otras íntimamente relacionadas y su producción está controlada por plásmidos. Su importancia reside en que al actuar como antibiótico ayuda a suprimir a las otras bacterias de la flora, facilitando la colonización de Pseudomonas aeruginosa (10, 31, 36).

F, 3.- Acido cianhídrico.

La producción de ácido cianhídrico por Pseudomonas aeruginosa es un fenómeno interesante, ya que se encuentra en los tejidos de animales muertos por infecciones con este microorganismo y que, además, han sido almacenados. No hay evidencia indicadora de la producción in vivo de suficiente cantidad de esta sustancia para ser responsable de síntomas tóxicos, pero en quemaduras colonizadas extensamente por este microorganismo puede contribuir en los efectos patológicos.

La importancia del ácido cianhídrico está ligada al aspecto médico legal, ya que es factible encontrar esta sustancia en las autopsias (10, 36).

F, 4.- Enzimas proteolíticas.

Pseudomonas aeruginosa produce comunmente varios tipos de enzimas proteolíticas que pueden licuar la gelatina, degradar la caseína y disolver la elastina y fibrina. Estas enzimas proteolíticas pueden ser producidas en elevada concentración en medios que no contengan glucosa y su actividad aumenta en presencia de ácido láctico, el cual tiende a acumularse en los tejidos infectados o dañados, por lo que representan uno de los principales factores en la patogénesis (10, 25, 36)

Elastasa y Proteasa.

Pseudomonas aeruginosa produce tres tipos de proteasas: neutra, semialcalina y alcalina (fracciones I, II y III, respectivamente) (42).

Las cepas elastasa positivas producen dos proteasas (fracción II y III) y las cepas elastasa negativas producen sólo una proteasa (fracción III). La proteasa neutra (fracción I) es producida por cepas tanto elastasa (+) como (-), pero su actividad es muy pequeña y despreciable (41).

Los tres tipos de proteasa poseen diferentes pH óptimos de actividad, de ahí sus nombres. Estos pH son: 6.5 (para la neutra, fracción I), 8.0 (para la semialcalina, fracción II) y 10.0 (para la alcalina, fracción III) (41).

La proteasa semialcalina (fracción II) difiere de las otras porque posee, además, actividad elastolítica. Es todavía desconocido cómo las actividades proteolíticas y elastolíticas residen en una sola enzima, que además parece similar a la elastasa pancreática (42).

Se ha demostrado por diversos estudios que tanto la actividad proteolítica como la elastolítica poseen el mismo sitio activo en la enzima. También se ha observado que la actividad elastolítica puede ser un carácter dissociante de las especies, además de ser Zn^{2+} dependiente (41, 42, 43).

La proteasa alcalina (fracción III) no muestra ninguna actividad elastolítica y es una metaloenzima, ya que depende del ión Ca^{2+} y algunos metales pesados pueden aumentar su actividad, como por ejemplo el ión Co^{2+} (41, 42, 43).

Cuando se inoculan proteasas y elastasa por vía intraperitoneal, intravenosa, intrapleural o intranasal se observan hemorragia pulmonar severa debido a la destrucción de las fibras elásticas de las arterias, hemorragias en pleura, diafragma, peritoneo y mucosa del tracto gastrointestinal. En la piel causa lesiones ulcerativas, hemorragia en el tejido subcutáneo y lesiones semejantes al eczema gangrenoso. En asa ligada de intestino la proteasa causa inflamación y atrofia de los plexos de Auerbach y hemorragia en los capilares de la submucosa; en cambio, la elastasa aunque produce también atrofia de los plexos de Auerbach, presenta hemorragia menos severa.

por lo que estas enzimas juegan un papel muy importante en la enteritis por Pseudomonas aeruginosa. En la córnea estas enzimas son responsables de opacidad, formación de úlceras, necrosis y destrucción total (10, 22, 25, 28).

Las dosis mínimas letales (DML) valoradas en un periodo de 24 horas, de acuerdo con diferentes rutas de inoculación, son (28, 36):

Vía:	Proteasa:	Elastasa:
Intravenosa	375 mg	30 mg
Intraperitoneal	200 mg	125 mg
Intrapleural	100 mg	62.5 mg

Como se ve, para la elastasa las dosis son menores. Esta enzima destruye la capa elástica de los vasos sanguíneos e inactiva al complemento, destruyendo todas las fracciones, con excepción de dos componentes (C₄ y C₇), lo cual puede asociarse a una pérdida secundaria de la quimiotaxis, disminución de la fagocitosis y la respuesta inflamatoria, ya que se impide la liberación de las enzimas lisosómicas (10, 28, 32).

Lecitinasas

Esta otra enzima proteolítica parece ser responsable de la induración y edema de la piel. La inyección por vía intraperitoneal o intravenosa causa necrosis primaria

en el hígado. Esta enzima posee también actividad leucocídica (4, 35).

Colagenasa

La colagenasa presenta una variedad de lesiones en los tejidos de los ratones, dependiendo de la vía de inoculación usada. Por instilación nasal provoca hemorragia pulmonar confluyente; por vía intraperitoneal hemorragias abdominales severas, con foco en la mucosa intestinal; por vía intravenosa hemorragia abdominal, petequias y necrosis focal en los pulmones; por inyección subcutánea lesiones necróticas y ulcerativas (10, 15).

F, 5.- Sustancias hemolíticas.

Las cepas de Pseudomonas aeruginosa producen dos sustancias hemolíticas. Una termolábil llamada fosfolipasa C, que cataliza la hidrólisis de la fosfatidilcolina (lecitina), dando fosforilcolina y diacilglicerol; la otra es glicolípido termoestable cuya estructura fue elucidada por Jarvin y Johnson (1949); este glicolípido es soluble en solventes lipídicos, lo que la hace diferente de las hemolisinas de la mayoría de las bacterias.

Este glicolípido parece tener una función de detergente, solubilizando los fosfolípidos, que aumentan la actividad de la fosfolipasa C. La producción de esta sustancia es favorecida por una baja concentración de fosfato y elevada concentración de glucosa.

El propósito fisiológico de estas hemolisinas en

el organismo del huésped, es el de actuar cooperativamente con la fosfatasa alcalina en la liberación del fosfato inorgánico de los fosfolípidos. Esto es particularmente interesante porque los pulmones de los humanos y animales poseen una cubierta surfactante, la cual está compuesta principalmente de fosfolípidos y, por lo tanto, la combinación de glicolípidos hemolíticos y de la fosfolipasa C pueden producir daños tisulares considerables en las infecciones pulmonares, además de aumentar la colonización en el tejido pulmonar y formar lesiones en la piel (7, 10, 32, 36).

F, 6.- Exotoxinas.

Muchas cepas de Pseudomonas aeruginosa pueden producir in vitro una exotoxina denominada Toxina A —probablemente también la originen in vivo— que inhibe en forma notoria la síntesis proteica en eucariotes, provocando edema y necrosis, choque hipotenso en perros y la muerte en ratones (25, 28, 31, 36). Esta Toxina A es de naturaleza proteica con un PM=54,000 y un punto isoeléctrico de 5.0 (46).

El mecanismo de acción de la Toxina A es idéntico al de la toxina diftérica, que actúa catalizando la transferencia de la 5-adenosín difosforribosa (ADPR), mediante la nicotinamín-adenosín-dinucleótico (NAD), al factor de elongación 2 (EF-2), dando como resultado el complejo adenosíndifosforribosa-factor de elongación-2 (ADPR-EF2), que es inactivo en la síntesis de proteínas (28, 44 52).

La LD₅₀ de la preparación purificada de Toxina A, administrada a ratones de un peso aproximado de 20_g fue de 6 mg de proteína aproximadamente (46).

Algunas cepas de Pseudomonas aeruginosa producen una segunda proteína extracelular (exoenzima S), que se ha demostrado tiene actividad de ADPR transferasa.

La exoenzima S difiere de la Toxina A en que no ADP-ribosila el factor EF-2, pero cataliza la transferencia del ADPR mediante el NAD a un gran número de sustratos de proteínas en los extractos de células eucariotes. La exoenzima S difiere también de la Toxina A en que es termoestable y aunque existe enorme evidencia de que la Toxina A es uno de los principales factores de virulencia de Pseudomonas aeruginosa, poco se conoce acerca del papel de la exoenzima S. Lo que se sabe es que en pacientes infectados por cepas capaces de producir ambas toxinas, el pronóstico de supervivencia es mucho menor que el de aquellos infectados por cepas productoras de una sola toxina (52, 56).

F, 7.- Enterotoxina.

En 1971, Kabota y Liu encontraron que la inyección de un cultivo de Pseudomonas aeruginosa en asa ligada de intestino de conejo causaba una gran acumulación de fluido. Tal efecto lo atribuyeron a una enterotoxina, que se ha asociado con cuadros diarreicos denominados curiosamente "fiebre de 5 días" o "fiebre de Shanghai". Esta enterotoxina no ha sido aún bien caracterizada, pero es termolábil y probablemente de naturaleza proteica (10, 31, 36).

F, 8.- Cubierta superficial.

La cubierta superficial de Pseudomonas aeruginosa es probablemente el equivalente funcional de las cápsulas de muchos bacilos Gram-negativos. La respuesta a la inoculación de esta cubierta es idéntica a la observada en el inicio de una infección letal, cuando se inocula el bacilo viable, presentándose las manifestaciones características de leucopenia y muerte (35, 51).

La cubierta superficial de Pseudomonas aeruginosa difiere de los lipopolisacáridos componentes de la superficie de otros microorganismos, tanto en sus propiedades químicas como biológicas, de las cuales podemos enumerar las siguientes:

Lipopolisacáridos (LPs)	Cubierta Superficial (CS)
1.- Sedimenta rápidamente por centrifugación.	No sedimenta a 105,000 g/3 horas.
2.- LD ₅₀ = 60 - 90 µg/g	LD ₅₀ = 30 µg/g
3.- Sólo reacciona con el suero anti-LPs	Sólo reacciona con el suero anti-CS
4.- No inhibe la fagocitosis	Inhibe marcadamente la fagocitosis
5.- Lípidos totales 21%	7%
6.- Contiene Ramnosa, glucosa y orcinol (+)	Manosa, galactosa y orcinol (-)

F, 9.- Producción y patogenicidad.

Se ha encontrado que las cepas de alta virulencia producen cantidades significativamente más altas de protea-

sas y gelatinasa, que aquellas de baja virulencia y que difieren en la producción de otras enzimas, tales como colagenasa, elastasa, fosfolipasa, fosfatasa alcalina, hemolisina y DNAasa, que son significativamente diferentes entre las cepas de alta y baja virulencia (25).

Para demostrar y estudiar el mecanismo de patogenicidad de las enzimas y productos de Pseudomonas aeruginosa se ha utilizado el modelo del ratón quemado, dando excelentes resultados (25).

G) SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.

Es un fenómeno común que la frecuencia de enfermedades causadas por Pseudomonas aeruginosa en muchos hospitales se encuentre en aumento. Las razones no han sido completamente determinadas, pero indudablemente existe una relación con el uso y abuso de los antimicrobianos, que han sido factores determinantes en la aparición o el incremento de la resistencia que presenta este microorganismo a la mayoría de los antibióticos comúnmente utilizados (23, 26, 27, 39).

Este incremento ocurre principalmente por una presión de selección del antibiótico, que facilita la proliferación de clones resistentes y el intercambio del material genético responsable entre las bacterias (23).

El principal mecanismo de resistencia entre estos microorganismos es a través de la transmisión de plásmidos R. Se han realizado diversos estudios para determinar el origen de estos plásmidos (Smith y Armour, 1966), en los que se ha encontrado evidencia de que los factores de transferencia de resistencia (FTR) hallados en Pseudomonas aeruginosa pueden provenir de las enterobacterias, observándose especialmente que cepas de E. coli podrían

transferir FTR a cepas de Pseudomonas aeruginosa sensibles, con una baja frecuencia (23, 27).

Existen otros estudios que ponen de manifiesto que la transferencia de la resistencia a drogas entre enterobacterias y Pseudomonas aeruginosa ocurre en la naturaleza (10, 27).

Entre las funciones que actúan como factores adicionales para el incremento en la patogenicidad de la bacteria, determinadas por los plásmidos, podemos mencionar las siguientes (14, 39):

- 1.- Replicación, reparación y recombinación.
- 2.- Fertilidad.
- 3.- Restricción y modificación.
- 4.- Resistencia a agentes antimicrobianos.
- 5.- Resistencia a metales tóxicos y detergentes.
- 6.- Resistencia a bacteriófagos.
- 7.- Metabolismo de azúcares y compuestos aromáticos.
- 8.- Adhesión celular.
- 9.- Virulencia.

Las diferentes formas de resistencia a los antimicrobianos conferidas por los plásmidos R, las podemos resumir como sigue (10, 13, 14, 30):

Actividad codificada
por plásmidos R.

Razón de la inacti-
vidad del antimicrobiano:

- | | |
|--|---|
| <p>A.- Sustancias producidas y localizadas en la membrana interna o externa, que impiden la entrada de la droga por interferencia con el sistema de transporte o por bloqueo de los poros.</p> | <p>El antibiótico no puede entrar a la célula.</p> |
| <p>B.- Producción de una enzima que modifica el sitio de acción de la droga en la sub-unidad 50S del ribosoma.</p> | <p>El antibiótico entra en la célula, pero la droga no se une al sitio de acción.</p> |
| <p>C.- Producción de una enzima que destruye al antibiótico por modificación o hidrólisis. La enzima puede ser intracelular, extracelular o ambas (por ejemplo β-lactamasa y acetilasas).</p> | <p>Dan como resultado un antibiótico inactivo.</p> |
| <p>D.- Producción de una enzima sustituida que sea resistente al antibiótico y que reemplace a una enzima antibiótico-sensible esencial.</p> | <p>La enzima sustituida permite que la célula crezca.</p> |

No todas las cepas de Pseudomonas aeruginosa son resistentes a la mayoría de los antimicrobianos de uso común, sino que existen cepas hipersusceptibles, como es el caso de las cepas mucoides. Esta característica de los antibióticos en las bacterias Gram-negativas, se ha correlacionado con alteraciones en la membrana externa, en particular en los lipopolisacáridos y en la composición de las proteínas (29).

Debido a que la terapia con antimicrobianos en enfermedades causadas por Pseudomonas aeruginosa da resultados insatisfactorios por las dificultades para lograr niveles adecuados en los tejidos, los efectos tóxicos de las drogas utilizadas y el problema de resistencia, se ha propiciado la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos naturales y sintéticos que puedan ser utilizados; tal es el caso de: Alpacilina, Piperacilina, Azlocilina, Cefoperazona, Ceftadizina, Moxalectama, etc. (29, 45, 54). De la misma manera se investigan otras formas de mejorar la actividad de los antibióticos, mediante bloqueadores de las enzimas que los inactiven, como por ejemplo el ácido clavulánico o por sinergismo en una misma vía metabólica o sitio de acción, como trimetropin/sulfametoxazol y piperacilina/tobramicina (16, 23).

Existen varios métodos para determinar la sen-

sibilidad de los microorganismos frente a diversas drogas o antimicrobianos:

Método de difusión a partir de discos (Kirby-Bauer), método de dilución, ya sea en tubo o en placa, prueba de inactivación de enzimas contra los antimicrobianos y pruebas automatizadas (33).

Entre estos métodos, el más usado por su facilidad es el de Kirby-Bauer, que realizado en forma correcta es confiable y comparable en sus resultados a las técnicas más laboriosas de dilución en tubo o placa, por lo cual es necesario tomar en cuenta los siguientes factores que influyen significativamente en el resultado de las pruebas:

Son especialmente importantes la densidad o tamaño del inóculo, incubación (tiempo y temperatura), pH del medio, atmósfera, estabilidad de los antimicrobianos, actividad metabólica de los microorganismos (20, 31, 33, 37). El efecto antagónico de los cationes divalentes en la actividad antibacteriana de los aminoglucósidos, polimixinas, tetracilinas y sulfonamidas es muy importante, ya que se ha observado que la adición de iones Ca y Mg al caldo de Mueller-Hinton provocan un efecto de aumento en las CMIs de aminoglucósidos y tetraciclina para Pseudomonas aeruginosa. En cambio, producen bajos efectos en las CMIs (Concentración Mínima Inhibitorias) de car-

bencilina (17, 33), condiciones que con el método de Kirby-Bauer no son fáciles de controlar.

En lo que se refiere al método de dilución en placa, utilizando un replicador de Steers, se tienen las siguientes ventajas:

- i) En una sola placa pueden probarse hasta 30 cepas diferentes.
- ii) Permite descubrir la presencia de contaminaciones.
- iii) Los resultados son reproducibles en un 95%.
- iv) Se puede efectuar control de la potencia y concentración de los antimicrobianos empleados (23).

Para la interpretación de las pruebas de susceptibilidad y de resistencia, se deben de tomar en cuenta:

- 1.- La relación entre la CMI o CML (concentración mínima letal) del microorganismo con los niveles de antimicrobiano en sangre o en algunos casos en orina u otro fluido.
- 2.- La relación de la susceptibilidad de la cepa probada con la de otros miembros de la misma especie.
- 3.- La experiencia clínica en el tratamiento del tipo particular de enfermedad involucrada (33).

Entre los agentes antimicrobianos más comúnmente utilizados y sus mecanismos de acción, se encuentran los siguientes (13, 14, 20, 33, 37):

AGENTE:	MODO DE ACCION:
Penicilinas y Cefalosporinas	Interfieren con la biosíntesis de la pared celular a través de la interacción con las uniones penicilina-proteína, provocando autólisis.
Cloranfenicol	Inhibe la síntesis de proteínas por la interacción con la sub-unidad 50S ribosomal.
Sulfonamida	Inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa. Bloquea la síntesis de tetrahidrofolato y rutas metabólicas relacionadas.
Tetraciclinas	Inhibe la síntesis de proteínas por interacción con la sub-unidad 30S ribosomal.
Estreptomina	Inhibe la síntesis de proteínas y causa falsa lectura en la traducción, por interacción con la sub-unidad 30S ribosomal.
Gentamicina Amikacina Tobramicina	Unen las sub-unidades 30S y 50S del ribosoma bacteriano. Causa falsa lectura en la traducción e inhibe la elongación de la cadena peptídica.
Rifampicina	Se une al factor sigma de la RNA polimerasa bacteriana y bloquea la transcripción (síntesis de RNA).
Nitrofuranos	No se conocen completamente. — Puede interferir con los procesos de óxido-reducción.
Acido Nalidixico	Interfiere con la replicación del DNA, inhibiendo la acción de la enzima DNA-girasa.
Polimixina B	Recubre la membrana celular de las bacterias y destruye el transporte activo y su función como una barrera de la permeabilidad selectiva. Actúa como detergente catiónico.

Según el promedio de los niveles que alcanzan en sangre los antibióticos más utilizados, podemos considerar las CMI para determinar si una cepa es sensible o resistente consultando la siguiente tabla (33, 37):

Antibióticos:	CMI requeridos ($\mu\text{g/ml}$) para:	
	Resistencia:	Sensibilidad:
Amikacina	≥ 38	< 12
Ampicilina	≥ 40	< 10
Carbenicilina	≥ 70	< 70
Cefalosporina	≥ 150	< 15
Cloramfenicol	≥ 40	< 11
Estreptomina	≥ 25	< 10
Gentamicina	≥ 12	< 4
Acido Nalidixico	≥ 32	< 12
Nitrofurazona	≥ 100	< 25
Polimixina B	≥ 8	< 2
Rifampicina	≥ 10	< 10
Tetraciclina	≥ 30	< 5
Tobramicina	≥ 12	< 1
Trimetropfn/Sul fameto- xazol	> 200	< 35

II.- PARTE EXPERIMENTAL.

A) MATERIAL.

1.- Cepas utilizadas.

Se emplearon cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de pacientes hospitalizados con quemaduras de 2o. y 3er. grado, del Hospital "Rubén Leñero", D.D.F. y de medio ambiente extrahospitalario, generalmente de agua de fuentes ornamentales.

Como cepa control se usó Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, proporcionada por Laboratorios Abbot de México.

2.- Medios utilizados.

a) Para aislamiento y caracterización:

Agar MacConkey (Difco), Caldo y agar nutritivo (Difco), Caldo Infusión cerebro-corazón (Difco), Agar infusión cerebro-corazón (BHI) dializado más leche descremada (53), Agar-agar (Merck).

b) Para la identificación bioquímica:

Agar Kligler (Merck), Gelatina nutritiva (Difco), Rojo de Metilo-Voges Proskauer (Merck), Medio de SIM (Difco), Medio de Citrato de Simmons agar (Merck), Medio DF base (Difco), Medio de descarboxilasa de Moeller (Merck), Medio infusión cerebro-corazón (Difco).

c) Para la determinación de exoenzimas:

Para hemólisis

Base de Agar Sangre (Bioxon)
y eritrocitos humanos 5%

Para la acción de la lipasa:	Lipase, Test agar, Poly-sorbante (tween 80) (33).
Para la coagulación del plasma:	Plasma humano citratado, fresco, dilución 1:4 con solución salina isotónica.
Para la acción de la fibrinolisisina:	Plasma humano + CaCl_2 al 0.25 %
Para la acción de la lecitinasas:	Base Agar Sangre (Difco) adicionado de 10% de una solución de yema de huevo + SSI (v/v). (33)
Para la acción de DNAasa:	Agar para prueba DNAasa (Bioxon)
Para la acción de la gelatinasa:	Gelatina nutritiva (Difco)
Para la acción de las proteasas:	Agar BHI dializado + leche evaporada (según Sokol y colaboradores) (53)
Para la acción de la elastasa:	Medio de elastina según fórmula (S. Barra) (49)

d) Para la determinación de pigmentos:

Agar Flo (Bioxon) y Agar Tech (Bioxon) (47)

e) Medio de conservación:

Peptona 2% (Merck) y Agar-agar 1.5% (Merck)

f) Para determinar susceptibilidad a los antimicrobianos:

Base agar de Mueller Hinton (Difco)

3.- Adiciones:

a) Carbohidratos: Glucosa, maltosa y xilosa (Merck) a una concentración del 10%.

b) L-aminoácidos (Merck): Arginina, Lisina y Ornitina al 1% para Descarboxilasa base Moeller.

4.- Antimicrobianos.

Acido Nalidixico, Lote F1j (Wintrop)
Ampicilina, Lote L-QMAA 8196 (Wyeth-Vaŕes)
Amikacina, Lote A 2662 (Difco)
Carbenicilina, Lote 2774 (Difco)
Cefalosporina, Lote 15/890/ARM, (Abbott)
Cloramfenicol, Lote 79132 (Park-Davis)
Estreptomicina, Lote 680277 (Wyeth-Vales)
Gentamicina, Control 8161-2 (Sheramex)
Nitrofurazona (Bermex)
Polimixina, Lote 143010 (Lab.Dr. Zapata)
Rifampicina, Lote 1090028 (Lepetit)
Sulfametoxazol (Roche)
Tetraciclina (Sigma Chem.)
Trimetropin (Roche)
Tobramicina (Elly-Lilly)

5.- Reactivos.

Acido clorhídrico (Merck)
Acido sulfamflico (Merck)
Alfa naftol (J.T.Baker)
Alfa naftil amina (J.T.Baker)
Azul de toluidina (Merck)
Colorantes de Gram.
Cloruro de calcio (Merck)
Cloruro de sodio (Merck)
Elastina (Sigma Chemical Co.)

Fosfato ácido dipotásico (Merck)
Fosfato ácido monopotásico (Merck)
Glicerol (J.T.Baker)
Hidróxido de sodio (Merck)
Reactivo de Ehrlich
Sulfato de fierro heptahidratado (Merck)
Sulfato de magnesio heptahidratado (Merck)
Sulfato de manganeso tetrahidratado
(Merck)

6.- Amortiguadores.

Amortiguador de fosfatos pH 4, 8 y 11.

7.- Material de vidrio.

Vasos de precipitado de 20, 100, 600 y
1000 ml. (Pyrex)
Probetas graduadas de 50, 100 y 1000 ml
(Pyrex)
Cajas de Petri de 100x20 (Pyrex)
Matraces Erlenmeyer grad. de 250 y
500 ml. (Pyrex)
Matraces volumétricos de 100 y 1000 ml.
(Pyrex)
Pipetas serológicas de 1/10x1/100,
1x1/10, 1x1/100, 5x1/10
y 10x1/10 (Pyrex)
Tubos de cultivo de 13x130, 16x150 y
22x175 (Pyrex)
Tubos de cultivo con tapón de rosca,
de 16x150 y 22x175 (Pyrex)

8.- Equipo.

Agitadora con regulador de temperatura (Scientific Precission)

Agitador Vortex Mod. R-90 (Lab-Line instruments)

Asa bacteriológica de nicromel.

Balanza analítica mod. H35 AR (Mettler)

Balanza granataria, doble plato capac. 2Kg mod. 1510 D (Ohaus)

Baño giratorio mod. G76 (New Brunswick Scientific)

Centrifuga de 5,200 rpm mod. k7165 (Damon/IEC Division)

Centrifuga 6,000 rpm refrigerada mod. CRU 5000 (Damon/IEC Div.0)

Cajas de Petri desechables de 100x20 (Technicare)

Estufa

Fotocolorímetro mod. 800-3 (Klett-Summerson)

Gradilla de alambre

Lámpara de luz U.V. Mod. UVL-56 (Black-Ray)

Mechero Fisher

Membrana de filtración de 0.45 μ m, 13 mm ϕ y 47 mm ϕ HAWP
(Millipore corporation)

Microscopio de contraste de fases (Nikon)

Microscopio óptico (Carl Zeiss)

Olla de presión de 20 lbs.

Papel "Parafilm"

Potenciómetro digital (Cole Parmer)

Pinzas millipore XX 6200006 (Millipore corporation)

Replicador de Steers

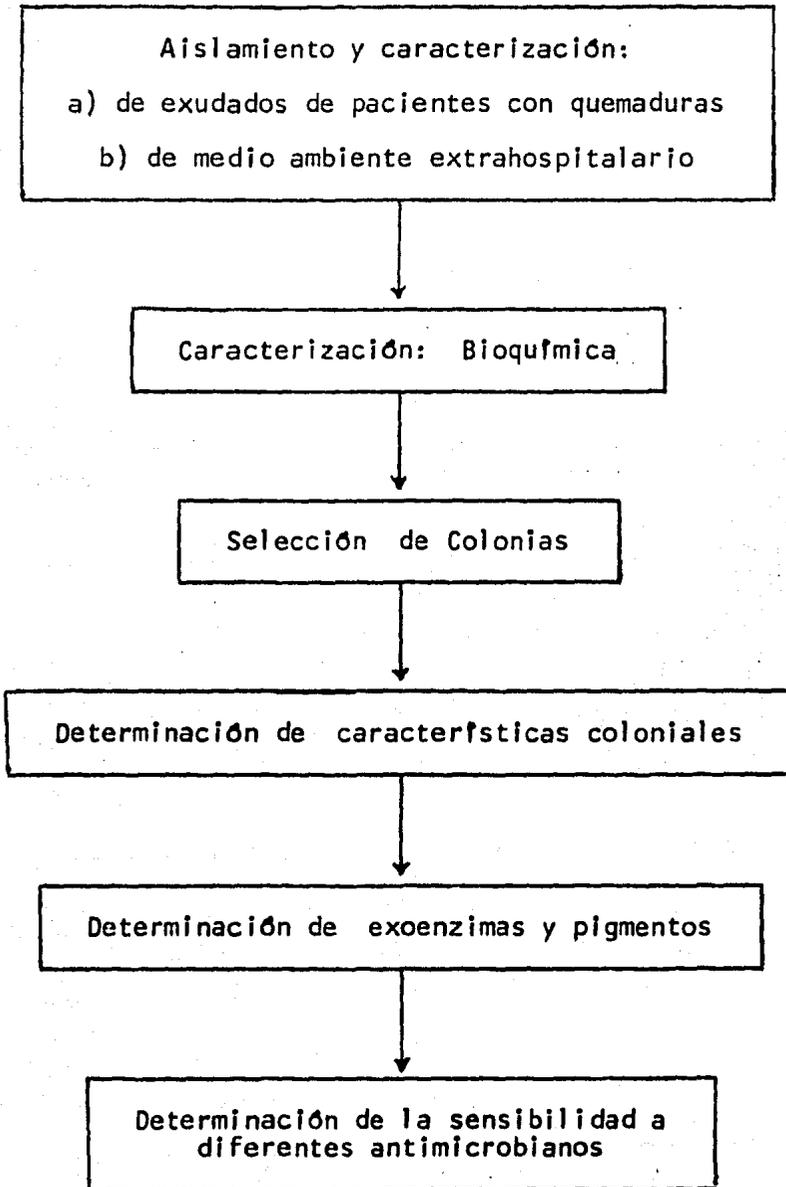
Tela de alambre con asbesto

Tripie

Tubo para centrifuga grad. de 50 ml Falcon

Unidades de filtración swinnex de 13 mm ϕ y 47 mm ϕ
(Millipore corporation)

M E T O D O



B) METODO.

1.- Aislamiento y caracterización.

- a) De exudados de pacientes con quemaduras. Se tomó la muestra con un hisopo de algodón, introduciéndose inmediatamente en condiciones estériles en Caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI), para utilizarse como medio de transporte. Con el mismo hisopo y ya en el laboratorio, se sembró en cajas de agar MacConkey.
- b) De medio ambiente extrahospitalario. Se tomaron muestras de 5 ml de agua de diversos sitios, generalmente de fuentes ornamentales, se agregaron a tubos con 5 ml de caldo MacConkey, al doble de la concentración usual y se incubaron de 24 a 48 horas (en ocasiones por 72 horas), hasta observar desarrollo, sembrándose a continuación una asada de este cultivo en agar MacConkey.

Las cajas inoculadas con las muestras de ambos orígenes se incubaron a 37°C, por 24 horas, con el fin de determinar, por morfología colonial, producción de pigmento y prueba de las oxidasas, la presencia de cepas de Pseudomonas aeruginosa.

2.- Tinciones.

Se realizó la técnica de tinción de Gram, modificación de Hucker para todas las cepas.

3.- Caracterización bioquímica.

Las pruebas bioquímicas se realizaron a fin de confirmar el diagnóstico presuntivo del aislamiento inicial, empleándose la siguiente serie:

H ₂ S	_____	(-)
Indofenol oxidasa	_____	(+)
Movilidad	_____	(+)
Glucosa OF abierto	_____	(+)
Glucosa OF cerrado	_____	(-)
Maltosa OF abierto	_____	(-)
Maltosa OF cerrado	_____	(-)
Xilosa OF abierto	_____	(+)
Xilosa OF cerrado	_____	(-)
Citrato de Simmons	_____	(+)
Producción de nitratos	_____	(+)
L-Lisina descarboxilasa	_____	(-)
L-arginina dihidrolasa	_____	(+)
L-ornitina descarboxilasa	_____	(-)
BHI a 42°C	_____	(+)

Pruebas realizadas con base en las recomendaciones de la Sociedad Americana de Microbiología (2).

Las cepas, una vez aisladas y plenamente identificadas, se sembraron en medio de conservación para su uso posterior.

4.- Observación de movilidad y confirmación de pureza.

De los tubos de conservación se tomó una pequeña asada y se suspendió en una gota de solución salina isotónica, observándose con el microscopio de contraste de fases la morfología, tamaño y movimiento de los bacilos.

5.- Diluciones y selección de colonias.

Del tubo de conservación se sembró cada una de las cepas en 5 ml de caldo nutritivo y se incubó durante 18 horas a 37°C. Una vez obtenido el crecimiento, se tomó una alícuota de 0.1 ml y se realizaron diluciones seriadas en tubo (con SSI), hasta obtener las diluciones de 10⁻¹⁸ y 10⁻²⁰.

De estas dos últimas diluciones se inocularon 0.1 ml en cajas con medio de BHI dializado con leche (incubándose a 37°C durante 18 horas), con el fin de obtener colonias perfectamente aisladas.

6.- Morfología colonial.

Una vez obtenidas las colonias aisladas, se procedió a determinar las características morfológicas de ellas: forma, aspecto, bordes, superficie, textura y tamaño; se escogieron las que mostraron diferencias y se sembraron una vez más en tubos con medio de conservación.

7.- Producción de exoenzimas y pigmentos.

Cada una de las cepas se sembró en 3 ml de caldo BHI, con incubación a 37°C durante 18 horas, usándose el replicador de Steers; se probaron 15 cepas en cada caja con los diferentes medios para realizar la determinación de hemolisinas, lecitinasa, lipasa, fibronolisina, coagulasa, gelatinasa, proteasa, DNAasa y elastasa. Los pigmentos piocianina y fluoresceína se determinaron en los medios indicados y bajo luz UV. En todas las determinaciones se incubó a 37°C, de 18 a 24 horas.

8.- Producción de las diferentes fracciones de proteasa.

- a) Las cepas problema se sembraron en 5 ml de BHI y se incubaron a 37°C durante 18 horas; de cada una de ellas se tomó una alícuota de 0.3 ml para inocularla en tubos de centrifuga conteniendo 30 ml de caldo nutritivo y se incubaron a 28°C durante 72 horas, con una agitación de 70 rpm.
- b) Una vez obtenido el crecimiento, se centrifugó a 3,500 rpm durante 45 minutos, se decantó el sobrenadante y se filtró con membrana Millipore de 0.45 μ m.
- c) Del filtrado se tomó 1 ml para cada uno de los problemas y se realizaron tratamientos de temperatura y pH:

Para temperatura se trató la muestra a 35°C, 50°C, 65°C y 75°C y para pH se agregó amortiguador de fosfatos hasta lograr los pH de 4, 8 y 11 por separado.

Una vez tratadas, de cada una de las muestras se sembró 0.1 ml por separado en cajas con agar BHI dializado + leche descremada y se observó, después de 24 horas, si existía actividad proteolítica.

La interpretación de estos resultados se realizaron con base al método y criterios del estudio efectuado por Morihara (41).

9.- Determinación de susceptibilidad a antimicrobianos.

La CMI (concentración mínima inhibitoria) se de-

terminó por el método de dilución en placa, usando Agar Mueller Hinton (2 y 55), a concentraciones graduadas de los antibióticos y un inóculo aproximado de 10^8 UFC (unidades formadoras de colonias), ajustando la densidad nefelométrica con un patrón McFarland # 4 (33) y utilizando el replicador de Steers.

Las cepas se sembraron primero en 3 ml de caldo BHI a partir del tubo de conservación, con el fin de tener un cultivo fresco. De ahí se tomó una alícuota de 0.1 ml y se inoculó en 5 ml de caldo de Mueller Hinton, incubándose durante 18 horas a 37°C .

Se colocó 1.0 ml de cada cultivo (que contiene aproximadamente 10^8 - 10^9 UFC) en los pozos de la placa del replicador, inoculándose 32 cepas en cada caja.

Las cajas se prepararon con 19 ml de medio de cultivo y 1.0 ml de cada dilución de los antimicrobianos.

Se emplearon 12 diluciones seriadas para los diferentes antimicrobianos, con un rango de concentración de 0.125 a 256 mg/ml. Se partió de una concentración de 10,000 $\mu\text{g/ml}$ del antimicrobiano.

En cada placa se inoculó una cepa testigo con un patrón conocido de sensibilidad a los antimicrobianos (Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853).

Se sembraron placas sin antibiótico para probar la pureza del cultivo y su viabilidad. La lectura se realizó entre 16 y 18 horas de incubación a 37°C .

Las diluciones de cada antimicrobiano se realizaron siguiendo la tabla:

Tubo	ml H ₂ O dest.	ml del antibiótico	conc. final en la caja $\mu\text{g/ml}$
1	4.88	5.12 (del antibiótico)	256
2	2.5	1.5 (del tubo # 1)	128
3	6.0	2.0 (" " # 1)	64
4	2.0	1.0 (" " # 3)	21.3
5	3.0	1.0 (" " # 3)	16
6	7.0	1.0 (" " # 3)	8
7	2.0	1.0 (" " # 6)	2.66
8	3.0	1.0 (" " # 6)	2.0
9	7.0	1.0 (" " # 6)	1.0
10	2.0	1.0 (" " # 9)	0.33
11	3.0	1.0 (" " # 9)	0.25
12	7.0	1.0 (" " # 9)	0.125

III.- RESULTADOS:

A) CARACTERISTICAS DE LA MORFOLOGIA COLONIAL.

En el presente trabajo se realizó la observación de las características de morfología colonial más comúnmente estudiadas, como lo son forma, aspecto, bordes, superficie y textura, notándose diferentes variedades en cada una de estas características (Gráfica # 1).

En cuanto a forma, se encontraron colonias alargadas, redondas, convexas, planas y umbilicadas; éstas últimas en un porcentaje muy bajo (10%) y sólo en las colonias de cepas aisladas de pacientes hospitalizados. El porcentaje más elevado, para las cepas de ambos orígenes, correspondió a las que presentaron forma convexa. También se pudo observar que en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados se presentaron con el mismo porcentaje tanto colonias alargadas como redondas (50%). En cambio, en las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario predominaron las colonias alargadas (67.74%).

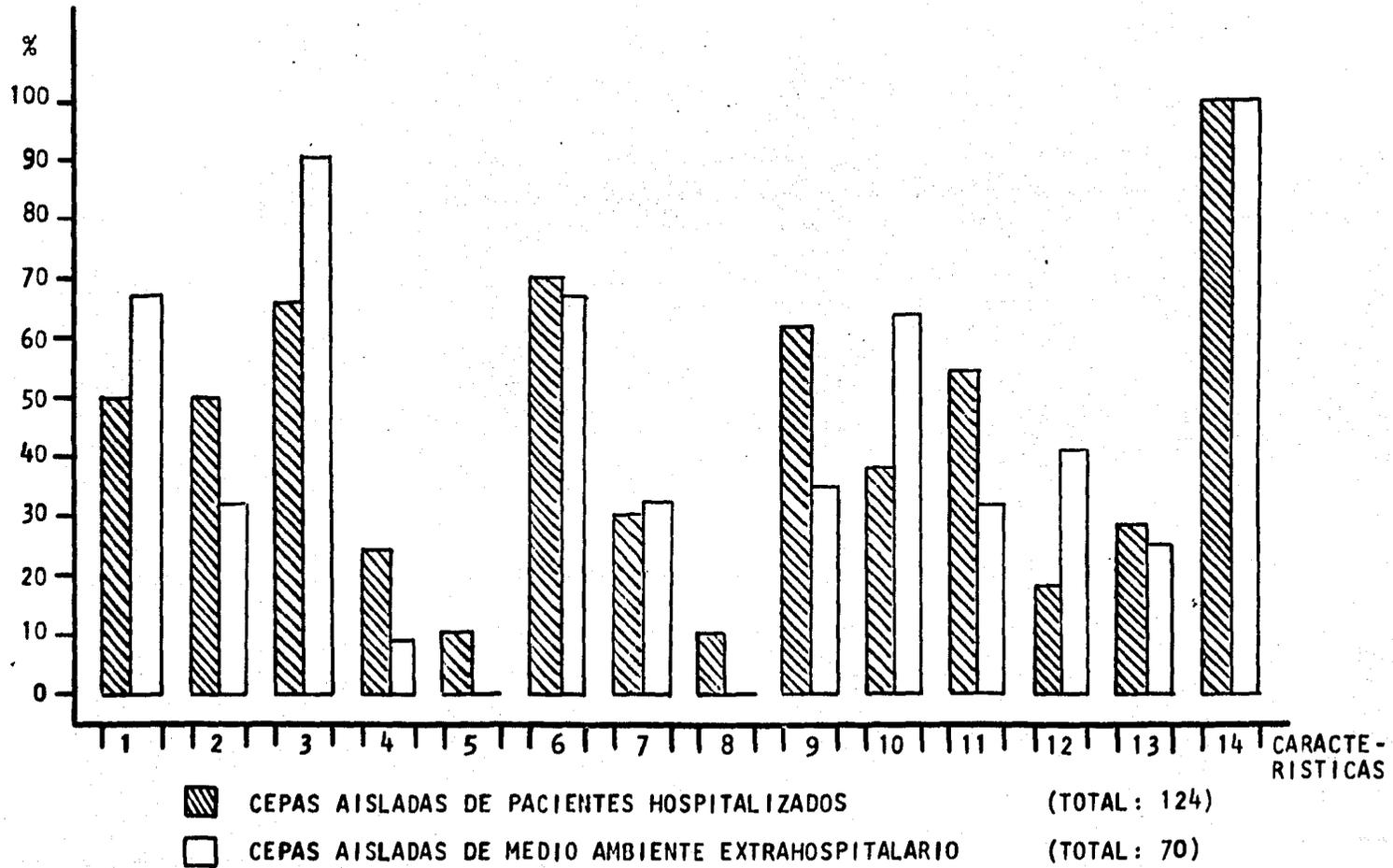
En aspecto, se observó un predominio de colonias brillantes en las cepas aisladas de ambos orígenes. En cambio las colonias mates se encontraron en menor proporción y en lo que se refiere al brillo metálico sólo se observó en colonias de cepas aisladas de pacientes hospitalizados.

Los bordes fueron tanto regulares como irregulares, encontrándose que en las cepas aisladas de hospital predominaron las del tipo regular (62.0%) y en cambio en las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario predominó el borde irregular (64.5%).

En lo que se refiere a superficie, se obtuvo en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados predominio de la variedad lisa (54.0%), siendo al contrario de las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario, donde el predominio fue de colonias rugosas. Las colonias semirrugosas se presentaron en proporción muy similar en las cepas de ambos orígenes.

Otra característica observada fue la textura, presentándose colonias blandas para el 100% de las cepas aisladas de ambos orígenes.

PORCENTAJE DE CEPAS QUE PRESENTARON DIVERSAS CARACTERISTICAS DE MORFOLOGIA COLONIAL



Continuación de la Gráfica # 1:

1.- Alargadas	}	Forma
2.- Redondas		
3.- Convexas		
4.- Planas		
5.- Umbilicadas		
6.- Brillantes	}	Aspecto
7.- Mates		
8.- Brillo metálico		
9.- Regulares	}	Bordes
10.- Irregulares		
11.- Lisas	}	Superficie
12.- Rugosas		
13.- Semirrugosas		
14.- Blandas	}	Textura

Según los resultados obtenidos en la observación de las características morfológicas reportados en la Figura 1, se realizó la siguiente agrupación de las variedades morfológicas que presentaron las cepas de Pseudomonas aeruginosa estudiadas:

	Hosp.	Med.Amb.
GRUPO I <u>Alargadas convexas:</u>		
Bordes regulares, superficie lisa	10 %	16.13 %
" irregulares, " "	4 %	—
" " " rugosa	6 %	19.35 %
" " " semirrugosa	2 %	22.58 %
" regulares " "	2 %	—
GRUPO II <u>Alargadas planas:</u>		
Bordes irregulares, superficie lisa	4 %	—
" " " rugosa	2 %	6.45 %
" " " semirrugosa	4 %	3.22 %
" regulares " "	10 %	—
" " " rugosa	2 %	—
GRUPO III <u>Alargadas umbilicadas:</u>		
Borde irregular, superficie lisa	2 %	—
" " " semirrugosa	2 %	—

	Hosp.	Med. Amb.
GRUPO IV <u>Redondas convexas:</u>		
Borde regular, superficie lisa	22 %	16.13 %
" irregular, " "	6 %	—
" regular, " rugosa	4 %	3.22 %
" irregular " "	4 %	12.9 %
" regular, " semirrugosa	6 %	---

GRUPO V Redonda plana:

Borde irregular, superficie rugosa	2 %	—
------------------------------------	-----	---

GRUPO VI Redonda umbilicada:

Borde regular, superficie lisa	2 %	—
" irregular, " "	4 %	—

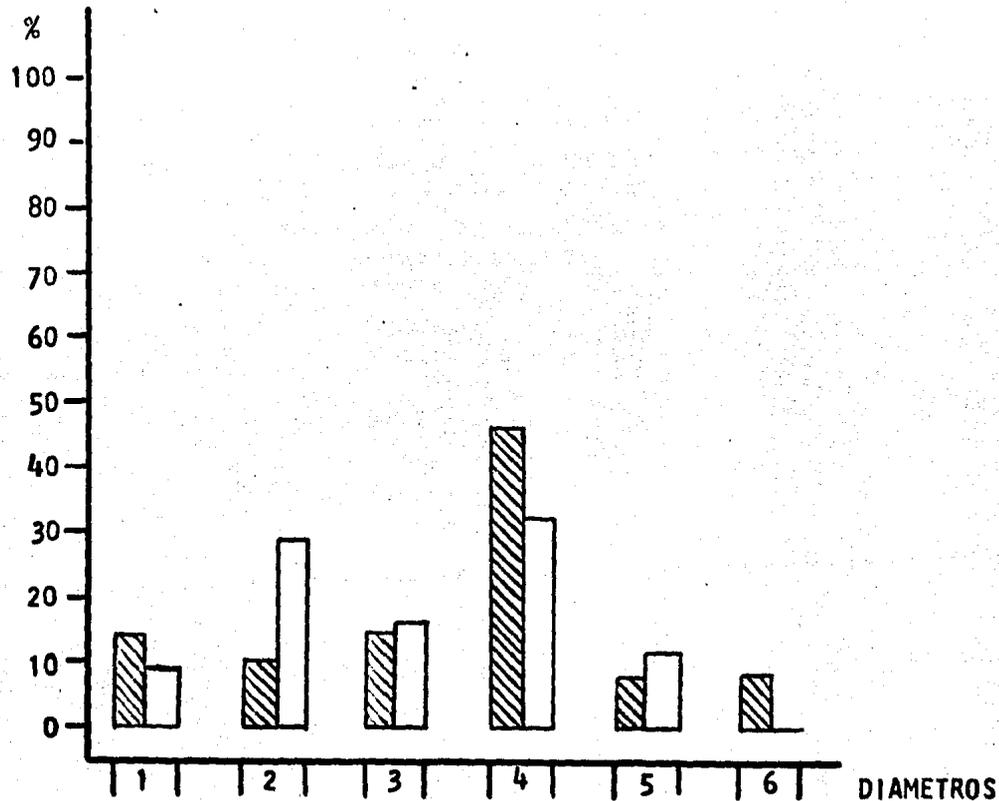
Se puede observar en la agrupación anterior que existe mayor número de variedades en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados (20 diferentes), que en las aisladas de medio ambiente extrahospitalario (8 variedades solamente).

B) DIAMETROS COLONIALES.

Las cepas estudiadas presentaron gran variedad en cuanto a su diámetro, como se puede observar en la Gráfica # 2.

El diámetro más frecuente correspondió al rango de 1 a 2 mm para las cepas de ambos orígenes (46.0 y 32.26%) y en segundo lugar al de 3 - 4 mm (10.0 y 29.0%), siendo escasa la frecuencia para el diámetro menor de 0.5 mm, observado solamente en cepas aisladas de pacientes hospitalizados (8%).

PORCENTAJE DE LOS DIVERSOS DIAMETROS COLONIALES DE LAS CEPAS ESTUDIADAS



▨ CEPAS AISLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

(TOTAL: 124)

□ CEPAS AISLADAS DE MEDIO AMBIENTE EXTRAHOSPITALARIO

(TOTAL: 70)

Continuación de la Gráfica # 2:

DIAMETRO EN mm

1.- 4.0 a 5.0

2.- 3.0 - 4.0

3.- 2.0 - 3.0

4.- 1.0 - 2.0

5.- 0.5 - 1.0

6.- — 0.5

Estas mediciones se realizaron en colonias perfectamente aisladas en medio sólido de leche dializada, con 24 horas de incubación a 37°C y un inóculo de 0.1 ml de una dilución de 1:10²⁰.

C) EXOENZIMAS RELACIONADAS CON LA PATOGENICIDAD.

Por los resultados obtenidos en la producción in vitro de exoenzimas relacionadas con la patogenicidad de Pseudomonas aeruginosa, Gráfica # 3, se puede observar que del total de cepas estudiadas (194) el mayor porcentaje de producción correspondió en orden decreciente a caseinasa, lipasa, DNAasa y gelatinasa.

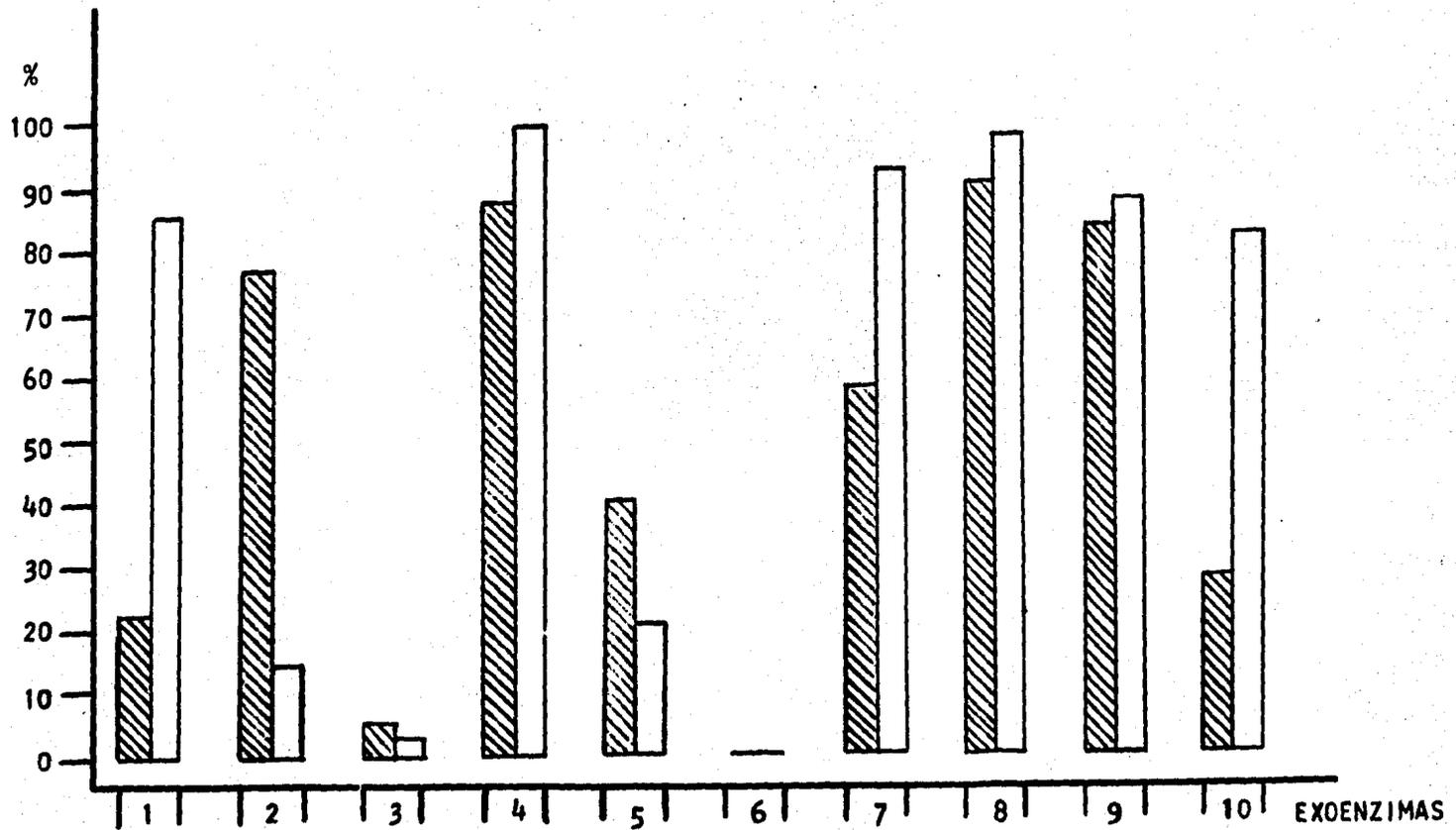
En cambio, las de menor producción fueron la fibrinolisisina y lecitinasa, con resultados negativos para la producción de coagulasa en las cepas estudiadas de ambos orígenes (0%).

Es de mencionarse que en este estudio las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario, con respecto a las aisladas de pacientes hospitalizados, presentaron una mayor producción de las siguientes exoenzimas: de manera muy significativa elastasa (82.86%), hemolisina tipo β (85.51%) y gelatinasa (92.86%) y en menor proporción lipasa (100%), caseinasa (98.53%) y DNAasa (88.57 vs 83.74%).

En el caso de la hemolisina tipo α , fibrinolisisina y lecitinasa, el predominio en la producción correspondió a las cepas aisladas de pacientes hospitalizados (con 77.31%, 40.65% y 5.65% respectivamente).

GRAFICA # 3

PORCENTAJE DE CEPAS POSITIVAS PARA LAS EXOENZIMAS RELACIONADAS CON LA PATOGENICIDAD



▨ CEPAS AISLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

(TOTAL: 124)

□ CEPAS AISLADAS DE MEDIO AMBIENTE EXTRAHOSPITALARIO

(TOTAL: 70)

Continuación de la Gráfica # 3:

- 1.- Hemolisina tipo β
- 2.- Hemolisina tipo α
- 3.- Lecitinasa
- 4.- Lipasa
- 5.- Fibrinolisisina
- 6.- Coagulasa
- 7.- Gelatinasa
- 8.- Caseinasa
- 9.- DNAasa
- 10.- Elastasa

D) PRODUCCION DE DIFERENTES FRACCIONES DE PROTEASA.

El estudio de las diferentes fracciones de proteasas, Gráfica # 4, evidenció la alta frecuencia de producción simultánea de las tres fracciones en las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario (63.23%).

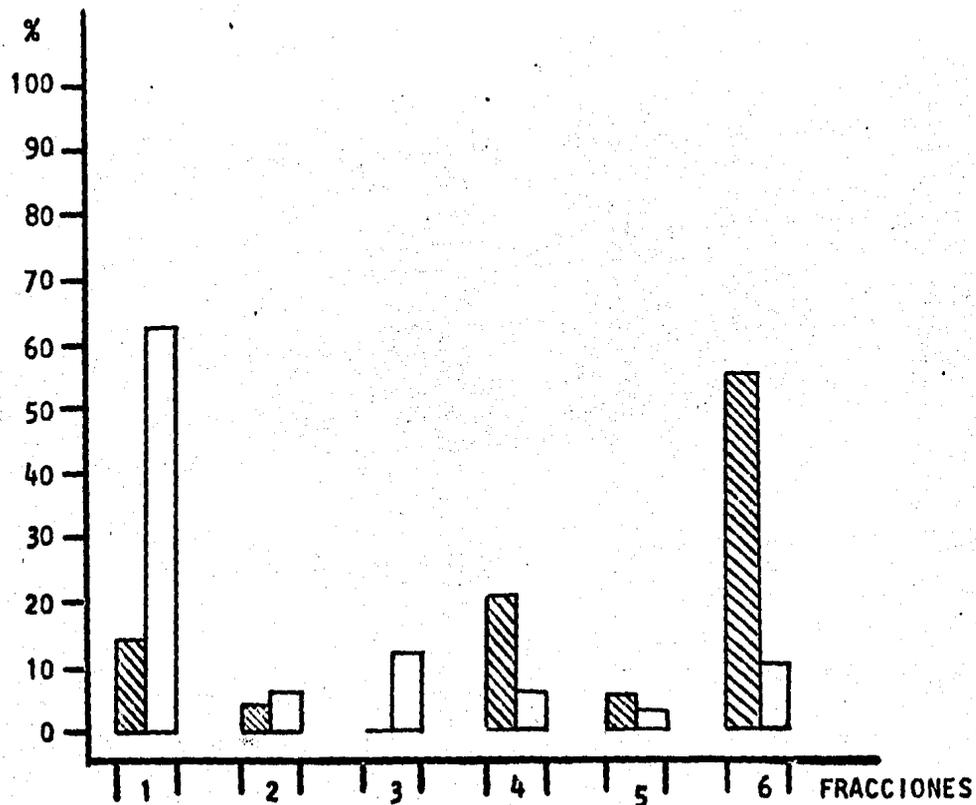
La producción simultánea de las fracciones I y II en las cepas de ambos orígenes (4.31% y 5.88%) no fue significativa, sucediendo lo mismo en el caso de la producción de la fracción III (5.17 y 2.94%).

La producción simultánea de las fracciones II y III solamente se encontró en cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario (11.76%).

Para la producción únicamente de la fracción II, los datos indican que se encontró predominantemente en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados (20.69%).

Es de tomarse en cuenta que la ausencia completa de actividad proteolítica se manifestó de una manera más elevada en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados (55.17%), con respecto a las aisladas del medio ambiente extrahospitalario (10.29%).

PORCENTAJE DE PRODUCCION DE DIFERENTES FRACCIONES DE PROTEASAS



CEPAS AISLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS (TOTAL: 116)

CEPAS AISLADAS DE MEDIO AMBIENTE EXTRAHOSPITALARIO (TOTAL: 68)

Continuación de la Gráfica # 4:

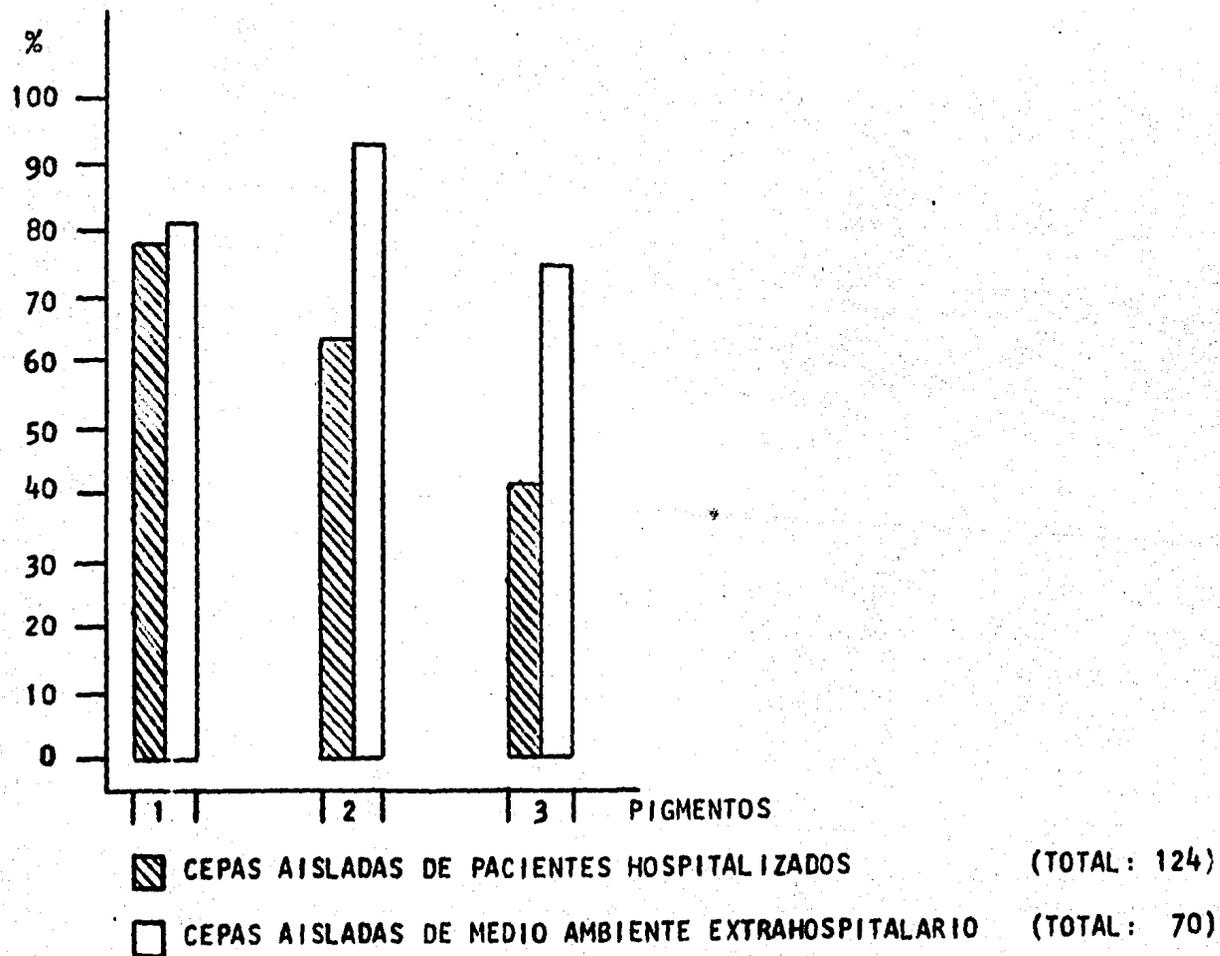
- 1.- Fracciones I, II y III.
- 2.- Fracciones I y II.
- 3.- Fracciones II y III.
- 4.- Fracción II únicamente.
- 5.- Fracción III únicamente.
- 6.- No se detectó actividad proteolítica.

E) PIGMENTOS: FLUORESCEINA Y PIOCIANINA

Como se puede apreciar en la Gráfica # 5, la diferencia en porcentaje de producción de fluoresceína en las cepas aisladas de ambos orígenes no fué significativa (77.97 y 81.16%), resultando una diferencia de producción de 3.19%, no así para piocianina, en donde la mayor frecuencia de producción correspondió a las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario (92.86%), con una diferencia de 29.30% con respecto a las cifras aisladas de pacientes hospitalizados (63.56%).

Con respecto a la producción de ambos pigmentos por una misma cepa, el mayor porcentaje de producción correspondió a las cepas aisladas del medio ambiente extrahospitalario (74.29%), con una diferencia del 32.7%.

PORCENTAJE DE CEPAS POSITIVAS PARA LOS PIGMENTOS ESTUDIADOS



(60 bis)

Continuación de la Gráfica # 5:

- 1.- Fluoresceína.
- 2.- Piocianina.
- 3.- Para ambos pigmentos.

F) SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.

Se estudiaron un total de 138 cepas de Pseudomonas aeruginosa, de las cuales 79 correspondieron a las aisladas de pacientes hospitalizados y 59 obtenidas de medio ambiente extrahospitalario. Todas las cepas se sometieron a tratamiento de susceptibilidad frente a catorce antimicrobianos, determinándose la Concentración Mínima Inhibitoria, la cual se considera como la concentración más pequeña que no permitió el desarrollo de la bacteria.

Los resultados obtenidos se graficaron con base en el porciento acumulativo de cepas inhibidas por los diferentes antimicrobianos utilizados, como se observa en las Gráficas # 6 a 19.

A partir de estas gráficas se obtuvieron las concentraciones requeridas para inhibir el desarrollo del 50%, 75% y 90% (CMI₅₀, CMI₇₅, CMI₉₀) de las cepas probadas con los diferentes antimicrobianos y asimismo determinar el rango de sensibilidad (Tabla # 1).

En la Tabla # 1, los diversos antimicrobianos utilizados se ordenaron de menor a mayor eficacia, en donde la amikacina mostró la mejor actividad contra las cepas sometidas a su acción, ya que se requirieron concentraciones de 8 µg/ml para inhibir el 75% de las cepas y únicamente de 16 a 21.33 µg/ml para inhibir el 90% de las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario y de pacientes hospitalizados, respectivamente.

Polimixina y tobramicina fueron los siguientes antimicrobianos que mejor resultado dieron, ya que se requirieron 64 μg para lograr CMI_{90} en cepas aisladas de pacientes hospitalizados. En el caso de la tobramicina, para las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario, los resultados que se reportan fueron superiores en cuanto a efectividad, incluso a los obtenidos con la polimixina y amikacina, ya que solamente se requirieron 2.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para inhibir el 90% de las cepas.

Otro aminoglucósido, la gentamicina, dió resultados aceptables, ya que su rango de sensibilidad (de 0 a 90%) varió de 0.33 a 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En el caso de rifampicina, tetraciclina, ácido nalidixico, cefalosporina y estreptomina, aun cuando sus resultados no fueron del todo aceptables, la CMI_{50} y CMI_{75} resultaron ser inferiores a los requeridos para cloramfenicol, nitrofurazona y ampicilina, ya que para lograr la CMI_{50} con estos últimos se requirieron más de 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Esta misma Tabla # 1 nos permite notar que las Concentraciones Míminas Inhibitorias de antimicrobiano requeridas para las cepas aisladas de pacientes hospitalizados casi siempre fueron superiores a las requeridas para cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario, con excepción de cefalosporina y rifampicina.

TABLA # 1

SENSIBILIDAD DE Pseudomonas aeruginosa A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS

ORIGEN DE LA CEPA *	AGENTE ANTIMICROBIANO	RANGO DE SENSIBILIDAD mg/ml	CMI mg/ml		
			CMI 50	CMI 75	CMI 90
1	AMPICILINA	256 - > 256	> 256	> 256	> 256
2		256 - > 256	> 256	> 256	> 256
1	NITROFUZAZONA	128 - > 256	> 256	> 256	> 256
2		256 - > 256	> 256	> 256	> 256
1	CLORAMFENICOL	21.33 - > 256	> 256	> 256	> 256
2		16 - 256	256	256	256
1	CARBENICILINA	8 - > 256	256	> 256	> 256
2		8 - 128	64	128	128
1	SULFAMETOXASOL/ TRIMETROPIN	16 - > 256	256	> 256	> 256
2		16 - 128	128	128	128
1	ESTREPTOMICINA	2.66 - > 256	256	256	> 256
2		1.0 - 8	8	8	8
1	CEFALOSPORINA	0.33 - 256	128	128	256
2		0.33 - > 256	64	128	> 256
1	AC. NALIDIXICO	8 - 256	21.33	128	256
2		8 - 128	21.33	128	128
1	TETRACICLINA	8 - 128	64	64	128
2		8 - 64	64	64	64
1	RIFAMPICINA	20 - 64	21.33	64	64
2		2.66 - 128	64	64	128
1	GENTAMICINA	0.33 - 64	21.33	64	64
2		0.33 - 16	2.0	2.0	16
1	POLIMIXINA	0.33 - 64	2.66	16	64
2		1.0 - 8.0	8	8	8
1	TOBRAMICINA	0.25 - 64	16	21.33	64
2		0.125 - 2.66	0.33	1.0	2.66
1	AMIKACINA	2.0 - 21.33	8	8	21.33
2		2.0 - 16.0	8	8	16.0

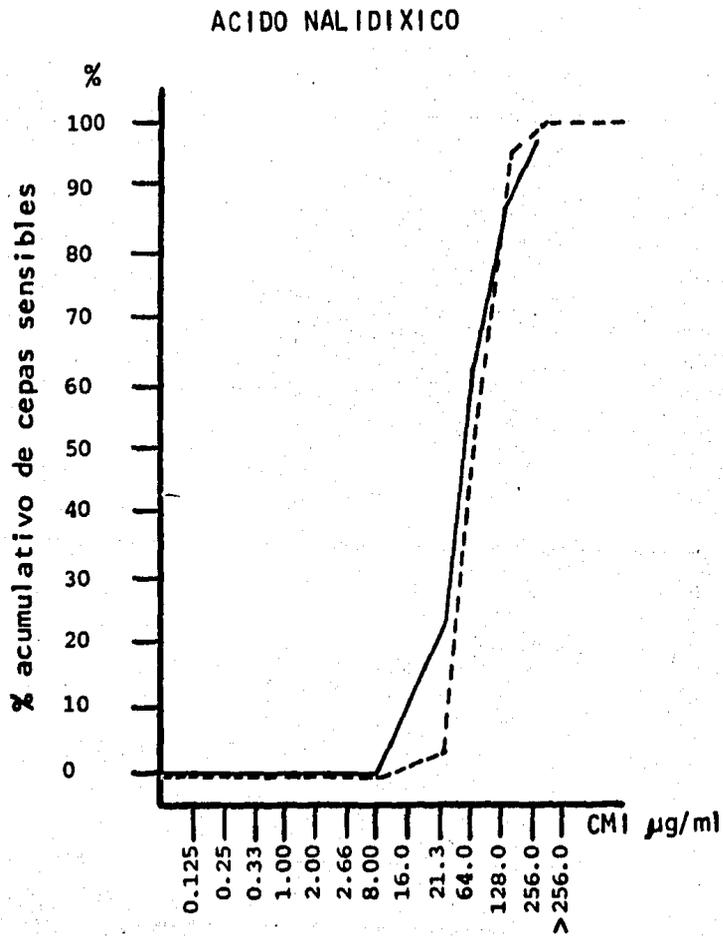
- * 1 Pacientes hospitalizados
2 Medio ambiente extrahospitalario

Si tomamos en cuenta los niveles que alcanzan en sangre los diferentes antimicrobianos (página 35) podemos construir la siguiente tabla para determinar el porcentaje de cepas sensibles:

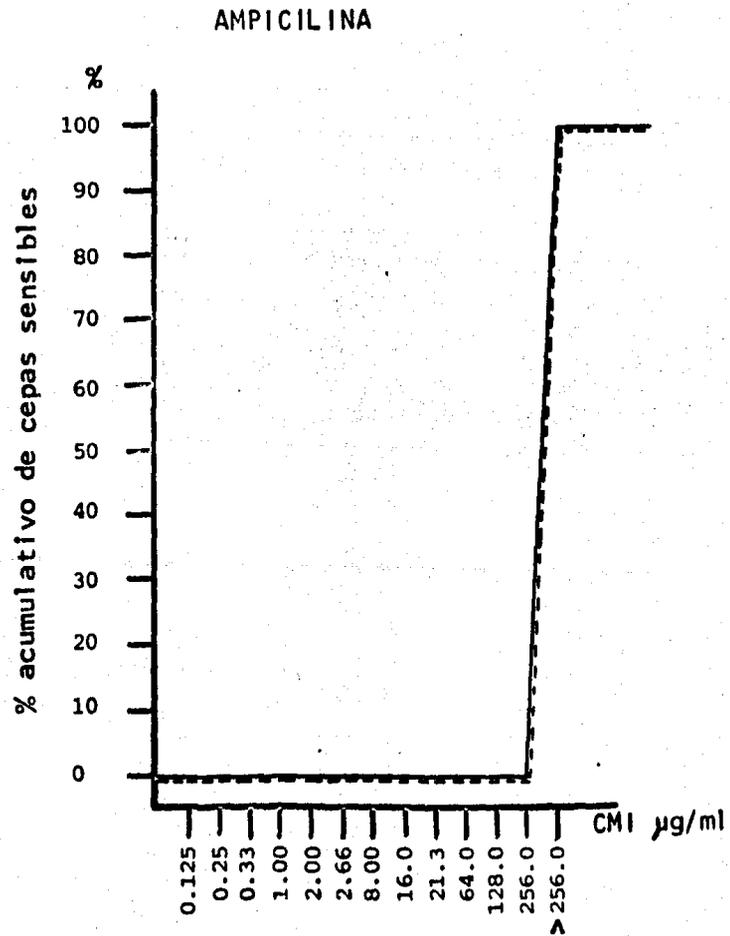
TABLA # 2

Antimicrobianos	% acumulativo de cepas sensibles	
	Pacientes hospitalizados	Medio ambiente extrahospitalario
Acido nalidixico	34 %	15 %
Amikacina	93 %	100 %
Ampicilina	0 %	0 %
Carbenicilina	28 %	65 %
Cefalosporina	82 %	80 %
Cloramfenicol	7 %	10 %
Estreptomina	18 %	99 %
Gentamicina	30 %	94 %
Nitrofurazona	0 %	0 %
Polimixina B	73 %	98 %
Rifampicina	10 %	5 %
Tetraciclina	25 %	50 %
Tobramicina	53 %	100 %
Trimetoprim/sulfametoxazol	59 %	94 %

GRAFICA # 6



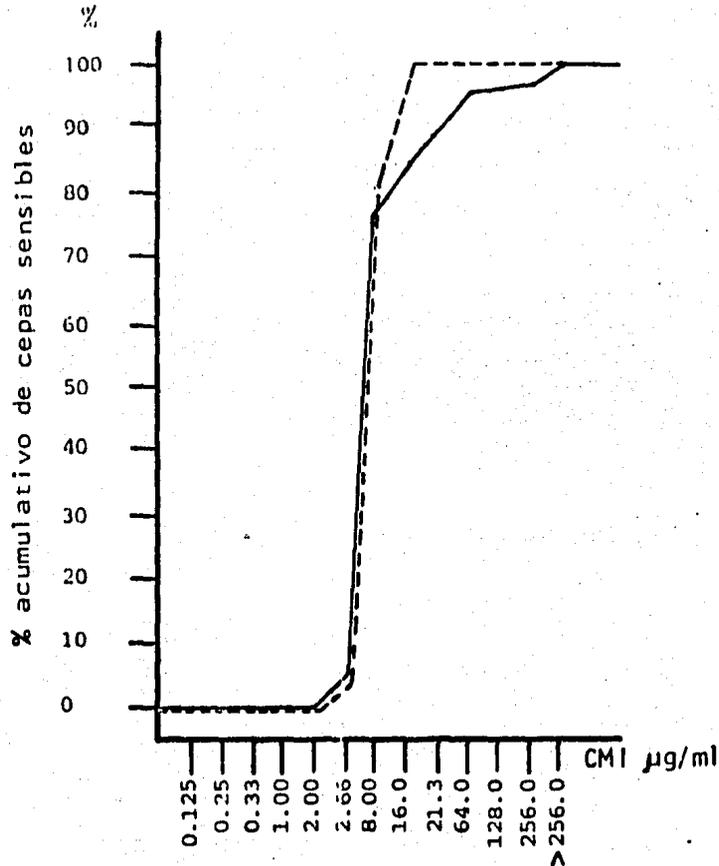
GRAFICA # 7



— Cepas aisladas de pacientes hospitalizados
--- Cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario

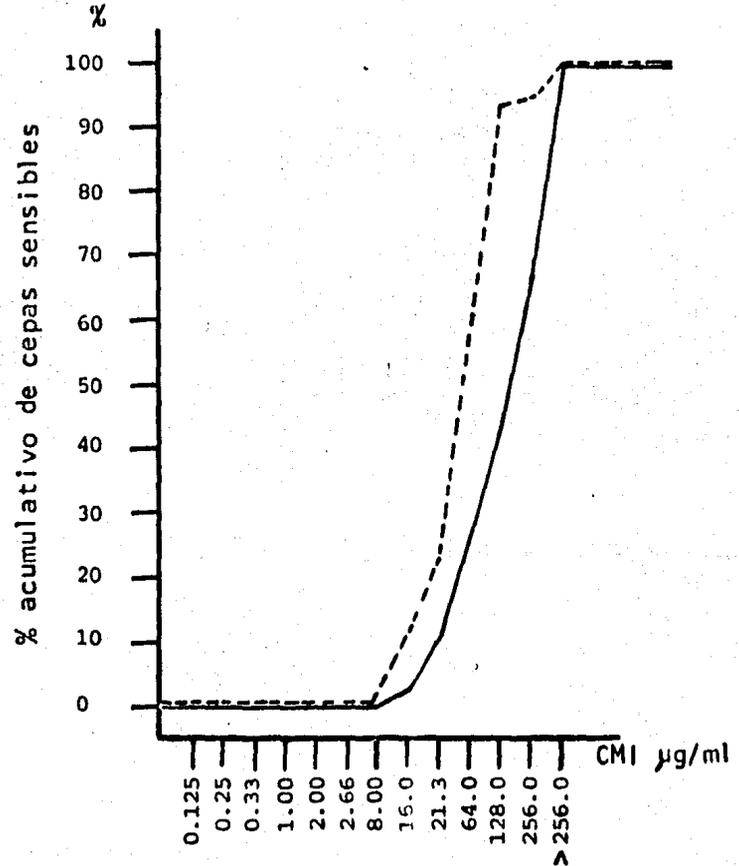
GRAFICA # 8

AMIKACINA



GRAFICA # 9

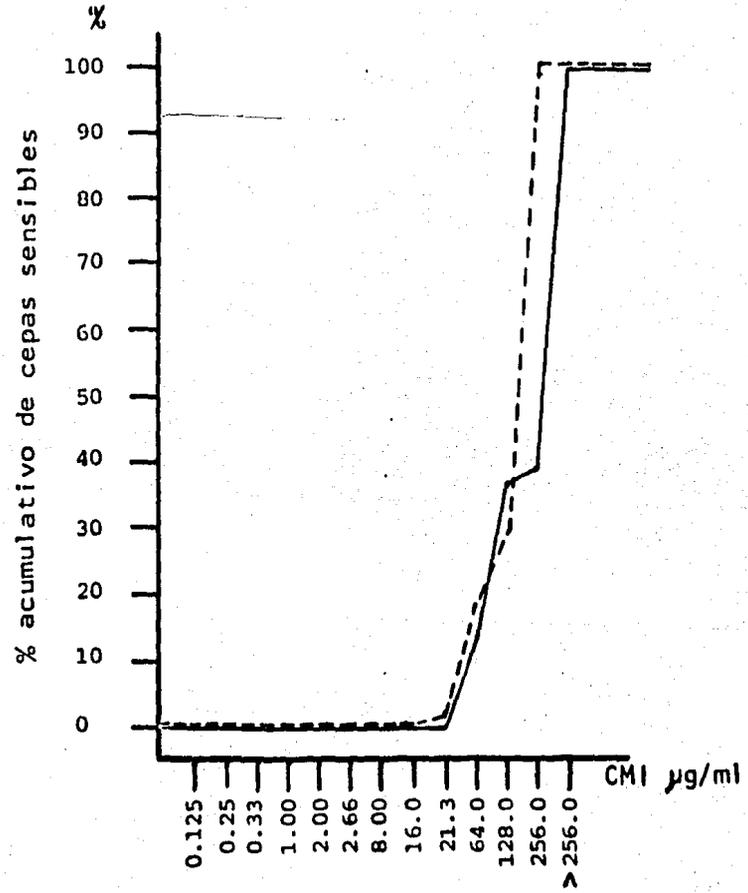
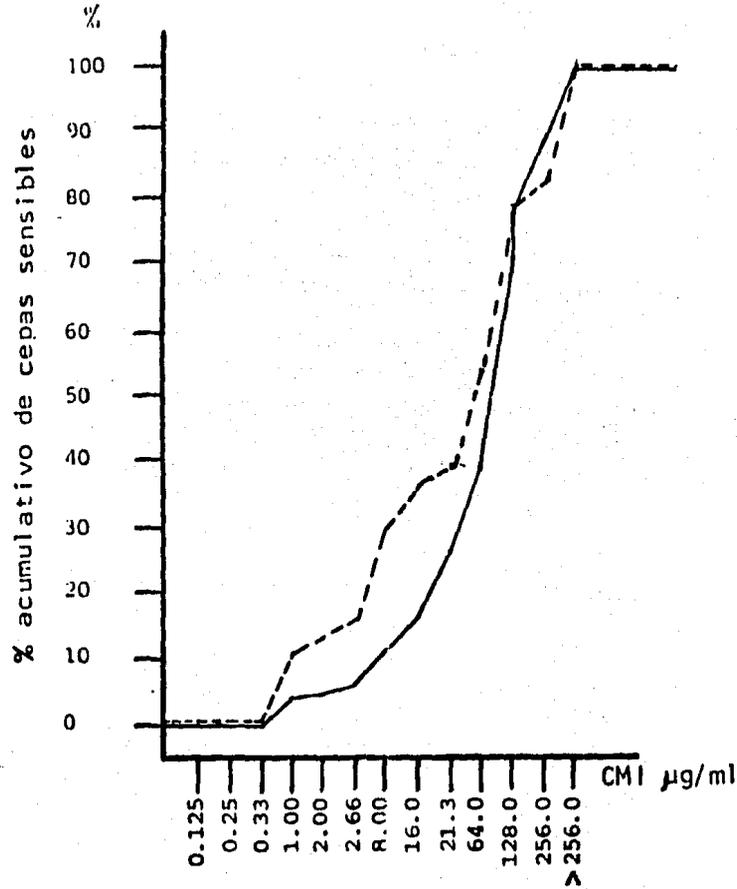
CARBENICILINA



— Cepas aisladas de pacientes hospitalizados
- - - Cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario

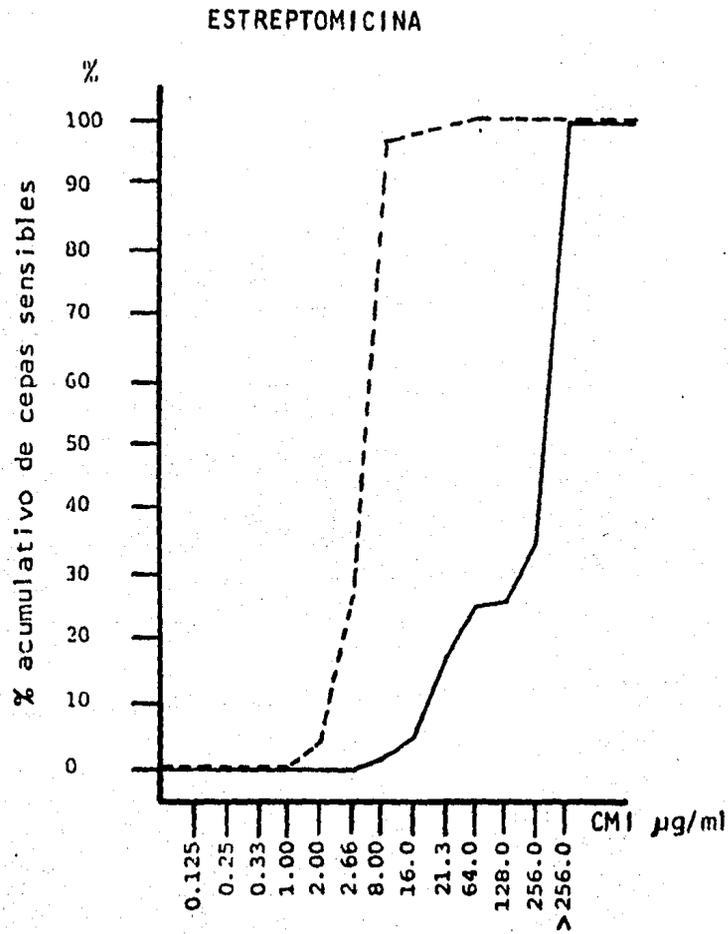
CEFALOSPORINA

CLORAMFENICOL

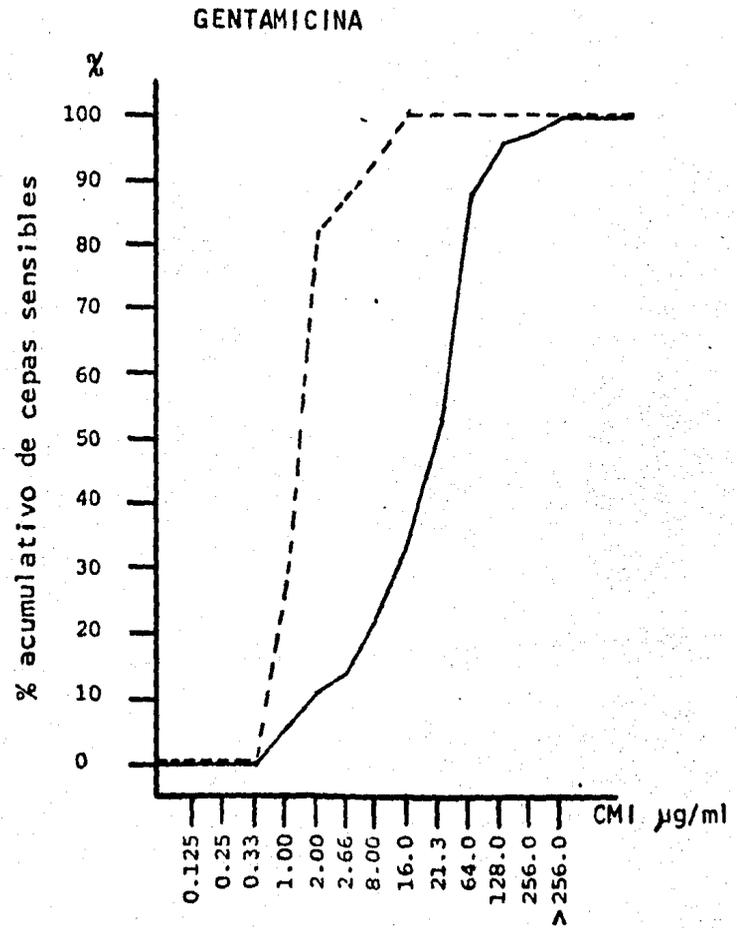


— Cepas aisladas de pacientes hospitalizados
 - - - Cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario

GRAFICA # 12

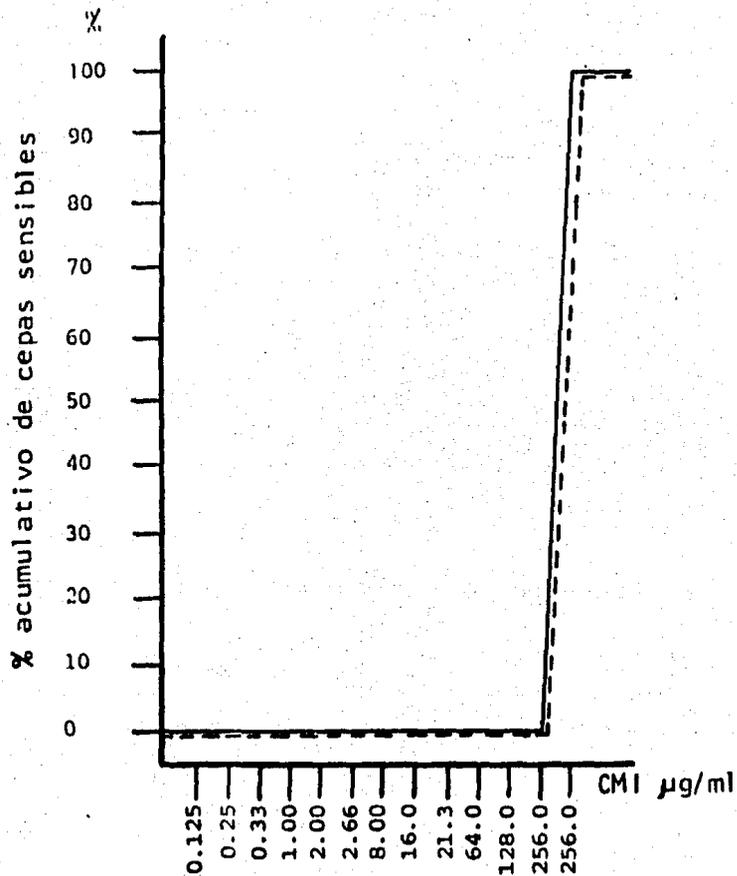


GRAFICA # 13

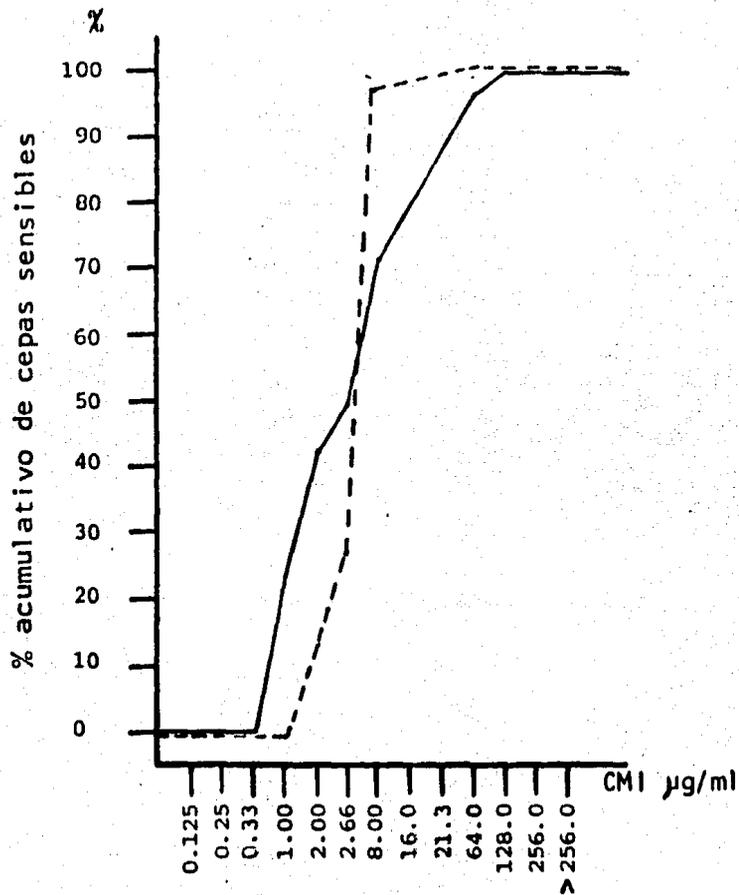


— Cepas aisladas de pacientes hospitalizados
 - - - - - Cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario

NITROFURASONA

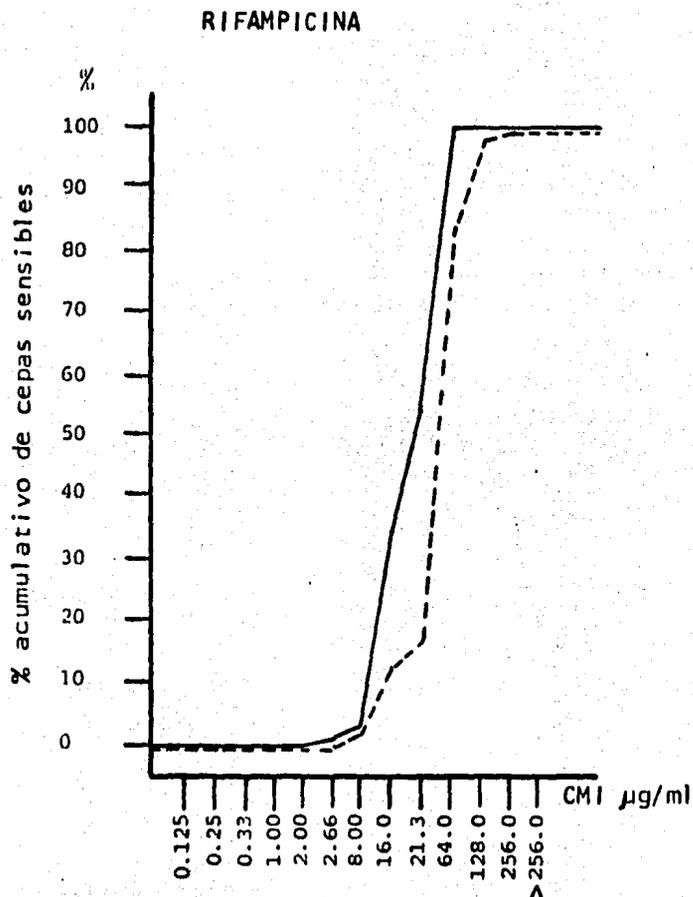


POLIMIXINA

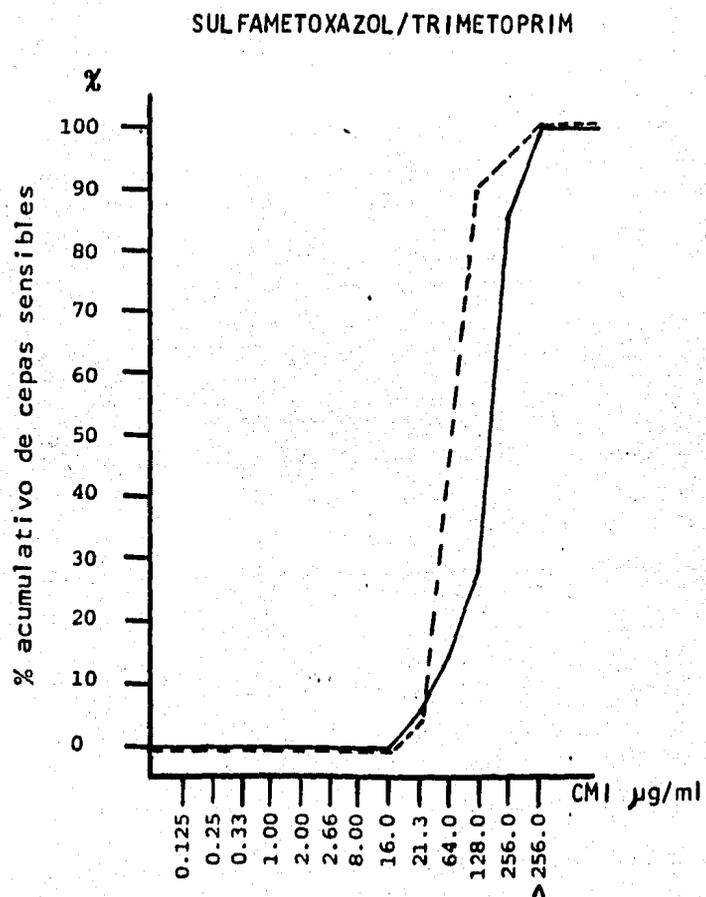


— Cepas aisladas de pacientes hospitalizados
 - - - Cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario

GRAFICA # 16

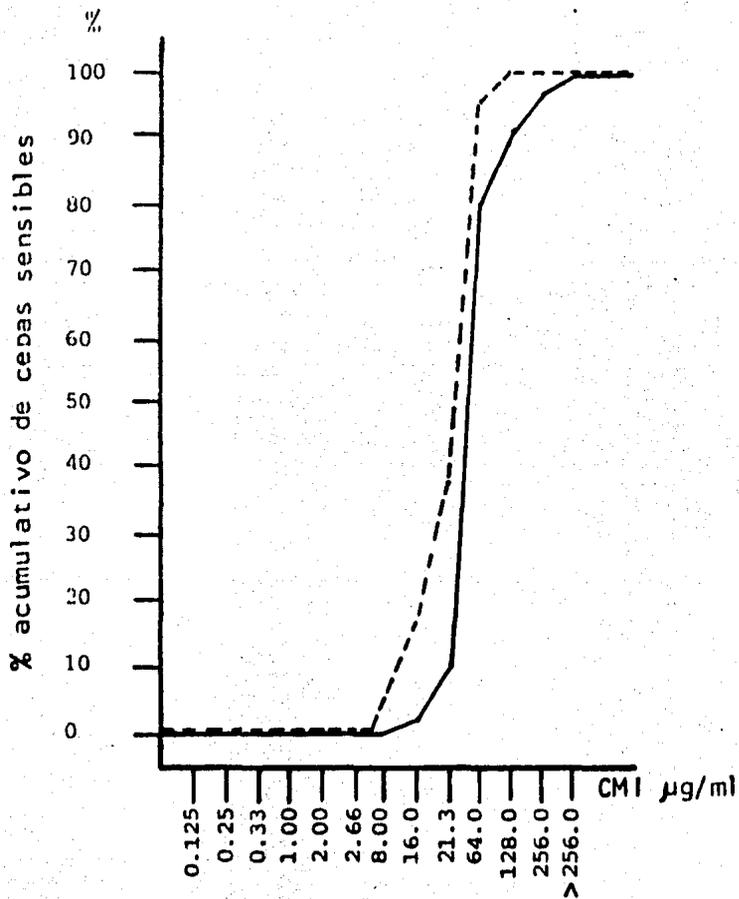


GRAFICA # 17

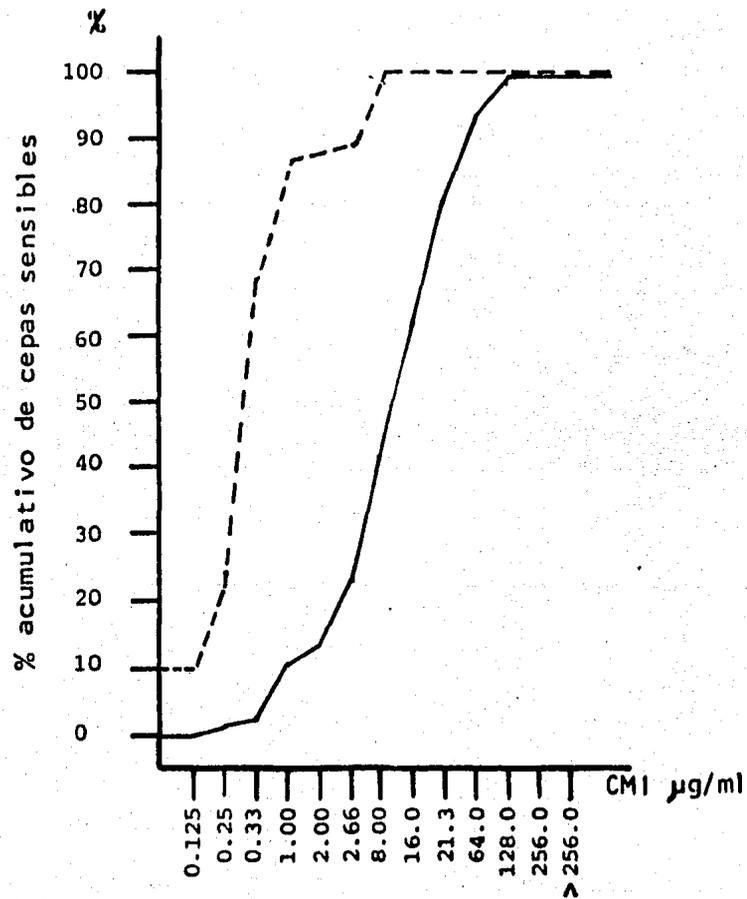


— Cepas aisladas de pacientes hospitalizados
 - - - - - Cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario

TETRACICLINA



TOBRAMICINA



— Cepas aisladas de pacientes hospitalizados
 - - - Cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario

IV. - DISCUSION DE RESULTADOS.

En lo que se refiere a las características de morfología colonial, la variación fenotípica se puso en evidencia al ordenar los resultados en seis grupos, encontrándose diferencias entre las cepas de los distintos orígenes. Se pudo notar mayor diversidad en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados, ya que de éstas se obtuvieron 20 variedades, observándose la máxima frecuencia en el grupo IV (redondas y convexas). Asimismo, se notó la ausencia de las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario en los grupos III, V y VI (alargadas-umbilicadas, redondas-planas y redondas-umbilicadas respectivamente), las cuales presentaron mayor frecuencia en el grupo I (alargadas-convexas); es decir, no mostraron colonias umbilicadas, ni tampoco brillo metálico, características que han sido asociadas a la presencia de bacteriófagos.

En la observación de la superficie, se encontró mayor incidencia de colonias lisas en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados que en las de medio ambiente extrahospitalario, entre las que predominó la variedad rugosa.

En el caso de bacterias patógenas u oportunistas, como lo es Pseudomonas aeruginosa, algunas de estas características de la superficie colonial, sobre todo la de ser lisa, pueden asociarse con la presencia de ciertos componentes en la superficie de la célula, los cuales confieren a

la bacteria mayor resistencia frente a los mecanismos de defensa del huésped y así contribuir en su patogenicidad.

Tanto en las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario como de pacientes quemados, no se encontraron cepas mucoides; esto tal vez ocurrió como resultado de la composición del medio utilizado —agar BHI dializado más leche— que no es el idóneo para el aislamiento de este tipo de colonias, muy susceptibles de sufrir variación espontánea a formas no mucoides.

Los diámetros coloniales obtenidos de las cepas de ambos orígenes fueron en general uniformes, con un predominio correspondiente al intervalo de 1 a 2 mm. En el grupo con diámetro de 3 a 4 mm, es decir de las más grandes, predominaron las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario; en cambio, en el diámetro de <0.5 mm se encontró un porcentaje muy bajo y sólo en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados, lo que refuerza la suposición de que las cepas formadoras de colonias de diámetros más pequeños, las llamadas "colonias enanas", son altamente colonizadoras, ya que únicamente se les encontró en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados.

Esta variación fenotípica observada en cuanto a la morfología colonial, puede estar condicionada —como se ha manifestado en la literatura— por la presencia de diversos agentes, como lo son los bacteriófagos y antimicrobianos. Aunque las cepas de ambos orígenes se encuentran en presencia de estos agentes, se puede inferir que es en

el medio hospitalario donde tienen una mayor participación, sobre todo los antimicrobianos, debido a que en los pacientes con quemaduras se emplean profusamente, no sólo como medida terapéutica sino además como profiláctica.

La producción in vitro de exoenzimas relacionadas con la patogenicidad de las 194 cepas estudiadas (124 aisladas de pacientes y 70 de medio ambiente extrahospitalario) en general fue muy elevada. En lo que se refiere a las enzimas proteolíticas (caseinasa, lecitinasa, gelatinasa y elastasa), que se han considerado en íntima relación con la patogenicidad por conferir facilidades para la invasión por la bacteria, el porcentaje de producción fue más elevado en las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario (con excepción de la lecitinasa, donde la producción fue mínima). Este fenómeno se observó también en la producción de DNAasa y de una manera muy significativa en la hemolisina tipo B, lo cual puede ser de cierta manera contradictorio a lo esperado, ya que es de pensarse que las cepas aisladas de pacientes hospitalizados tuvieran mayor poder patógeno y que éste se relacionara directamente con la producción de exoenzimas.

En la detección de las diferentes fracciones de proteasas, al parecer las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario se encuentran enzimáticamente mejor "armadas" que las cepas aisladas de pacientes hospitalizados, ya que a las primeras se les encontró una alta frecuencia de producción simultánea de las fracciones I, II y III.

En cambio, en las segundas, fue alto el porcentaje de cepas en que no se detectó actividad proteolítica. Pero en lo que se refiere a la producción de la fracción II, que es la que posee actividad elastolítica, fue mayor el porcentaje en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados.

Lo anteriormente expuesto nos conduce a pensar que las cepas aisladas de pacientes hospitalizados son cepas que han sido multitratadas, lo que tal vez pueda provocar una baja en la producción de exoenzimas o bien que algunos de los factores genéticos que determinan la producción de estas se pierdan o atenden fácilmente, aunque existan algunos que sí persisten, como podría ser el caso de la fracción II de la proteasa, en la que se ha demostrado ampliamente su relación con la patogenicidad, por poseer propiedad elastolítica y que, al parecer, su actividad no se atenda fácilmente.

Con respecto a los pigmentos, no se encontró diferencia notable en la producción de fluoresceína entre las cepas de ambos orígenes; pero, por el contrario, sí se presentó diferencia en la producción de piocianina y en la de ambos pigmentos al mismo tiempo, ya que las cepas de medio ambiente extrahospitalario presentaron mayor porcentaje de producción. En el caso de la piocianina, a la que se le han atribuido ciertas propiedades antimicrobianas, es de pensarse que las cepas de medio ambiente extrahospitalario están mayor capacitadas para su producción, ya que en este medio la competencia con otras bacterias es mayor.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que se ha caracterizado desde hace varios años por ser multirresistente, capacidad propiciada por el uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, lo que se puso de manifiesto en el presente trabajo al determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los diferentes antimicrobianos de uso común. Prueba de ello lo constituyen los β -lactámicos, como son la ampicilina, carbenicilina y cefalosporina, que requirieron concentraciones de 128 a mayores de 256 $\mu\text{g/ml}$. Debido al amplio uso que se da a estos productos, se ha reportado desde hace varios años su escasa eficiencia. En el caso de tobramicina, gentamicina y rifampicina, aun cuando los resultados no fueron del todo satisfactorios, se encontraron entre las que presentaron valores de CMI más bajos. En la amikacina se utilizaron concentraciones de 8 $\mu\text{g/ml}$ para la CMI₇₅; este dato se pudo esperar si se toma en cuenta que, a pesar de que es un producto con algunos años de empleo, su uso no es muy frecuente a consecuencia del costo del tratamiento.

Es de mencionar igualmente que en el caso de la gentamicina cabría esperar que la CMI₅₀ encontrada fuera mayor, si tomamos en consideración que junto con los β -lactámicos se utiliza de manera rutinaria en pacientes quemados. A pesar de que la CMI₅₀ encontrada fue pequeña, es necesario tomar en cuenta que los niveles que alcanza este antimicrobiano en sangre son muy pequeños, hecho que nos pone de manifiesto la influencia del medio hospitalario

en la susceptibilidad frente a los antimicrobianos. Si analizamos la Tabla # 2, de la página 64, nos podemos dar cuenta más claramente de este fenómeno, ya que frente a casi todos los agentes antimicrobianos (con excepción del ácido nalidíxico de manera más significativa) las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario fueron más susceptibles, al encontrarse los porcentajes de sensibilidad más altos en estos casos.

Nos podemos dar cuenta también de lo alarmante que es esta situación al observar el caso de la estreptomina y gentamicina, en donde más del 90% de las cepas aisladas del medio ambiente extrahospitalario fueron sensibles y, en cambio, en cepas aisladas de pacientes hospitalizados, sólo el 18% y 30% fueron sensibles para cada antimicrobiano. Esto pone claramente de manifiesto el problema de resistencia que acarrea el uso indiscriminado de los antimicrobianos, ya que en los últimos años la gentamicina se usa de manera rutinaria en los pacientes quemados.

En el caso de la ampicilina y nitrofurazona, no se encontraron cepas sensibles en ninguno de los dos orígenes, lo que implica la ineficiencia de estos antimicrobianos en la terapéutica de las enfermedades causadas por este microorganismo.

La resistencia que presentan las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario frente a los diversos antimicrobianos (por ejemplo ampicilina) pudo ser adquiri-

da por procesos de transferencia de material genético (por ejemplo conjugación y transducción) al encontrarse en contacto con la naturaleza y con otros microorganismos que poseen esta información de resistencia, o bien que sean productores de antimicrobianos; esto, sin descartar la factibilidad de que se trata de cepas que hayan estado involucradas anteriormente como causantes de enfermedades en el humano y por lo tanto en contacto con estos agentes.

Un dato que llama la atención es que en el caso de la tobramicina, gentamicina, cefalosporina, estreptomina, trimetoprin/sulfametoxazol y carbenicilina, la CMI_{50} fue mayor para las cepas aisladas de pacientes hospitalizados, en comparación con las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario, comportamiento que coincidió con lo esperado, ya que muestra la mayor resistencia de estas cepas frente a los antimicrobianos.

V. - CONCLUSIONES.

— La mayor variación fenotípica desde el punto de vista morfológico se encontró en cepas aisladas de pacientes hospitalizados. De los grupos formados se encontró un máximo de frecuencia en los grupos I (alargadas y convexas) y IV (redondas y planas) y un mínimo en el grupo V (redondas y planas). No se encontraron cepas formadoras de colonias mucoides.

— En cuanto al diámetro, las cepas de ambos orígenes presentaron con mayor frecuencia los comprendidos en el intervalo de 1 a 2 mm y sólo las cepas aisladas de pacientes hospitalizados presentaron diámetros menores de 0.5 mm.

— De las 10 exoenzimas estudiadas, sólo para la coagulasa la producción fue nula, en tanto que la hemolisina fue producida por el 100% de las cepas de ambos orígenes. Se observó significativamente mayor frecuencia de producción de la gelatinasa, elastasa, hemolisina tipo β y las fracciones I, II y III de proteasas, en las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario, mientras que en la producción de la fracción II predominaron las cepas aisladas de pacientes hospitalizados.

— La diferencia encontrada en la producción de pigmentos consistió en que tanto en la producción de piocianina sola, como de piocianina y fluoresceína por una misma cepa, fue mayor para las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario.

— De los 14 antimicrobianos probados, en los que se encontró mayor susceptibilidad de las cepas in vitro fueron: amikacina, polimixina B y tobramicina. En general, se observó mayor sensibilidad en las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario.

— En el presente trabajo fue posible determinar las diferencias que presentaron las cepas aisladas de dos diferentes orígenes en lo que se refiere a morfología colonial, pigmentos, exoenzimas y susceptibilidad a antimicrobianos y según los resultados obtenidos se pudo comprobar que el medio en donde se encuentre una bacteria influye en sus características fenotípicas. Se observó en general una baja en la producción de exoenzimas y una mayor resistencia a los antimicrobianos en las cepas aisladas de pacientes hospitalizados.

— En lo que se refiere a la producción de exoenzimas, sería recomendable probar un número más elevado de cepas provenientes de fuentes de aislamiento más diversas (por ejemplo: suelo), ya que en el presente trabajo las cepas aisladas de medio ambiente extrahospitalario provinieron casi exclusivamente de agua de fuentes ornamentales, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que sean cepas que hayan tenido algún contacto con el humano y así comprobar de una manera más exhaustiva la influencia del medio ambiente.

— Para los antimicrobianos se comprobó la elevada resistencia que presentan las cepas de Pseudomona aeruginosa, lo que

sugiere la necesidad de la realización periódica de estudios epidemiológicos de sensibilidad de estas bacterias a los antimicrobianos, con el fin de poder determinar la terapéutica de elección. Aún más recomendable sería la búsqueda de otras alternativas terapéuticas contra las enfermedades causadas por este microorganismo, como podría ser el uso de una vacuna adecuada.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adler, L. J., Finland M.: Susceptibility of Recent Isolates of Pseudomonas aeruginosa to Gentamicin, Polymyxin and Five Penicillins with Observations on the Pyocin and Immunotypes of Strains. Appl. Microbiol. 22: 870-875 (1971).
- 2.- American Society for Microbiology.: Identification of Glucose Non-Fermenting Gram Negative Rods. Committee on Continuing Education. (1981).
- 3.- Baltimore R. S., Dobek S. A., Stark F.R., Artenstein S. M.: Clinical and Epidemiological Correlates of Pseudomonas Typing. J. Infect. Dis. 130: S60. (1974).
- 4.- Batch L. A., Griffin E.P., Hammer M. : Pseudomonas aeruginosa Bacteremia: Relationship of Bacterial Enzyme Production and Pyocin Types with Clinical Prognosis in 100 Patients. J. Lab. Clin. Med. 93: 600-606. (1979).
- 5.- Bennett V. J., Brachman S. P. HOSPITAL INFECTIONS. 1a. ed. Little, Brown and Co. (1979).
- 6.- Bergey A.: BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8a. ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore. (1974).

- 7.- Berka M. R., Gray L.G., Vasil M.L. : Studies of Phospholipase C (Heat-Labile Hemdysin) in Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 34: 1071-1074. (1981).
- 8.- Bobo R.A., Newton E.J., Faye J.L., Farmer L.H. and Farmer III J.J.: Nursery Outbreak of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 9: 479-484. (1979).
- 9.- Bradly D.E., A Function of Pseudomonas aeruginosa PAO Polar Pili: Twitching Mobility. Can. J. Microbiol. 26: 146-154. (1980).
- 10.- Clarke P.H., Richmond M.H.: GENETICS AND BIOCHEMISTRY OF PSEUDOMONAS. 1a. ed. John Wiley & Sons. (1975).
- 11.- Cox D.C., Parker J.: Use of 2-Aminoacetophenone Production in Identification of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 9: 479-484. (1979).
- 12.- Curtis Nigel A.C., Orr. D., Ross W.G., Boulton G.M.: Competition of B-lactam Antibiotics for the Penicillin-Binding Proteins of Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter cloacae, Klebsiella aerogenes, Proteus rettgeri and Escherichia coli: Comparison with Antibacterial Activity and Effects upon Bacterial Morphology. Antimicrob. Agent. Chem. 16: 325-328. (1979).

- 13.- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood B.W.: TRATADO DE MICROBIOLOGIA. 2a. ed. Salvat Editores, S. A. (1978).
- 14.- Davies J.: MECHANISMNS OF ANTIBIOTIC RESISTENCE. The Upjohn Co. (1980).
- 15.- Diener B., Carrick L., Berck S.R. In vivo Studies with Collagenase from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 7:212-217. (1973).
- 16.- Fass J.R.: Comparative In Vitro Activities of B-Lactam-Tobramycin Combinations Against Pseudomonas aeruginosa and Multigrug-Resistant Gram-Negative Enteric Bacilli. Antimicrob. Agents. Chemoter. 21: 1003-1006. (1982).
- 17.- Fass J., Barnishan J.: Effect of Divalent Cation Concentrations on the Antibiotic Susceptibilities of Nonfermenters Other than Pseudomonas aeruginosa. 16: 434-438. (1979).
- 18.- Gerald L., Gilardi P.H.D.: Pseudomonas Species in Clinical Microbiology. The Mount Sinai J. Med. 43:710-726. (1976).
- 19.- Giono S., Garcia- Padilla M.E., Barriga G.: Tipificación Pilocnina de Pseudomonas aeruginosa Aislada del Hospital General del Centro Médico "La Raza" del IMSS. Rev. Lat-amer. Microbiol. 24: 69-76. (1982).

- 20.- Goodman S.L., Gilman A.: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS. 5th ed. MacMillan Publishing Co. Inc. (1975).
- 21.- Govan J.R.W.: Mucoid Strains of Pseudomonas aeruginosa: The Influence of Culture Medium in The Stability of Mucus Production. J. Med. Microbiol. 8: 513-522. (1975).
- 22.- Gray L., Kreger A.: Microscopic Characterization of Rabbit Lung Damage Produced by Pseudomonas aeruginosa Proteases. Infect. Immun. 23: 150-159. (1979).
- 23.- Guiscafré G.H., García P.M., Trejo J.A., Gómez E.J., Martínez G.C.: Resistencia de Enterobacterias y Pseudomonas. Recomendaciones Terapéuticas. Rev. Med. IMSS. (México) 20: 485-492. (1982).
- 24.- Heckman G.M., Babcock B.J., Rose H.D.: Pyocine Typing of Pseudomonas aeruginosa: Clinical and Epidemiologic Aspects. Amer. J. Clin. Path. 57: 35-42. (1972).
- 25.- Holder I.A., Haidaris G.C.: Experimental Studies of the Pathogenesis of Infections due to Pseudomonas aeruginosa: Extracellular Protease and Elastase ad in vivo Virulence Factors. Can. J. Microbiol. 25: 593-599. (1979).
- 26.- Holmes R.K., Minshew H.B., Sanford P.J.: Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Aminoglycoside Antibiotics. J. Infect. Dis. 130: S163-S165. (1974).

- 27.- Holloway B.W.: Genetics of Pseudomonas. Bacteriol Rev. 33: 419-443. (1964).
- 28.- Homma Y.J.: Roles of Exoenzymes and Endotoxin in the Pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa and the Development of a New Vaccine. Japan. J. Exp. Med. 50: 149-165. (1980).
- 29.- Irwin T.R., Govan R.W.J., Fyfe A.M.J., Costerton W.J.: Heterogeneity of Antibiotic Resistance in Mucoid Isolates of Pseudomonas aeruginosa obtained from Cystic Fibrosis Patients: Role of Outer Membrane Proteins. Antimicrob. Agent Chemoter. 19: 1056-1063. (1981).
- 30.- Jacoby A.G., Sutton L.: Activity of B-lactam Antibiotics Against Pseudomonas aeruginosa Carrying R.Plasmids Determining Different β -Lactamases. Antimicrob. Agents Chemoter. 16: 243-245. (1979).
- 31.- Jawetz E., Melnick J.L., Adelgerg A.E.: MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA. 9a. ed. El Manual Moderno, S.A. (1981).
- 32.- Karioka S., Liu P.V.: Effect of the Hemolysin of Pseudomonas aeruginosa on Phosphatides and on Phospholipase C Activity. J. Bacteriol. 93: 670-674. (1967).

- 33.- Lennette E.H., Balows A., Houston W.J., Truant J.P.:
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. American Society for
Microbiology. 3th. ed. USA. (1980).
- 34.- Lindberg B.R., Latta L.R.: Phage Typing of Pseudomonas
aeruginosa Clinical and Epidemiologic Considerations.
J. Infect. Dis. 130: S33-S42. (1974).
- 35.- Liu P.V.: The Roles of Various Fractions of Pseudomonas
aeruginosa in its Pathogenesis II Effects of
Lecithinase and Protease. J. Infect. Dis. 116: 112-116.
(1966).
- 36.- Liu P.V.: Extracellular Toxins of Pseudomonas aeruginosa.
J. Infect. Dis. 130: S94-S99. (1974).
- 37.- Lorian V.: ANTIBIOTICS IN LABORATORY MEDICINE.
Williams & Williams. Baltimore/London. (1980).
- 38.- Lynch M.J., Raphael S., Mellor L., Spore P., Inwood J.H.:
METODOS DE LABORATORIO. 2a. ed. Ed. Interamericana. (1972).
- 39.- Marques M.A., Congregado F., Simon-Pujol M.D.:
Antibiotic and Heavy Metal Resistance of Pseudomonas
aeruginosa Isolated from Soils. J. Appl. Bact.
47: 347-350. (1979).
- 40.- Martin R.D.: Mucoïd Variation in Pseudomonas aeruginosa
Induced by the Action of Phage. J. MeJ. Microbiol.
6: 111-118. (1973).

- 41.- Morihara K.: Production of Elastase and Protease by Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 88: 745-757. (1964).
- 42.- Morihara K.: Production of Elastase and Protease by Pseudomonas aeruginosa Elastase. J. Biol. Chem. 240: 3295-3304. (1965).
- 43.- Morihara K., Tsuzuki H.: Production of Elastase by Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Patients. Infect Immun. 15:679-685. (1977).
- 44.- Morihara K., Sanai Y., Tsuzuki H., Jyoyama H., Hirose K., Homma Y.J., Kato I.: Effects of Proteases on the Structure and Activity of Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A. Infect. Immun. 34:435-440. (1981).
- 45.- Neu C.H., Labthavikul P.: In vitro Activity of Alpacillin Compared with that of other New Penicillins and Anti-Pseudomonas Cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemoter. 21: 906-911. (1982).
- 46.- Pavlovskis R.O., Callahan L.T., Meyer D.R.: Characterization of Exotoxin of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 130: S100-S102. (1974).
- 47.- Pichardo E.A., Bale M.J., Wayne H.C., Matsen M.J.: Identification of Pseudomonas aeruginosa by Pyocyanin Production on Tech agar. J. Clin. Microbiol. 13: 456-458. (1981).

- 48.- Saellinger B.C., Snell K., Holder I.A.: Experimental Studies on the Patogenesis of Infections due to Pseudomonas aeruginosa: Direct Evidence for Toxin Production During Pseudomonas infection of Burned Skin Tissues. J. Infec. Dis. 136: 555-561. (1977).
- 49.- S. Barra A.J.: Nature. London. 188:322-323. (1960).
- 50.- Scribner K.R., Marks I.M., Weiss H.A., Tarpay K., Wech F.D.: Activities of Various β -Lactams and Aminoglycosides, Alone and in Combination, Against Isolates of Pseudomonas aeruginosa from Patients with Cystic Fibrosis. Antimicrob. Agents Chemoter. 21:939-943. (1982).
- 51.- Sensakovic W.J., Bartell F.P.: The Slime of Pseudomonas aeruginosa: Biological Characterization and Possible Role in Experimental Infection. J. Infect. Dis. 129:101-109. (1974).
- 52.- Sokol A.P., Iglewiski H.B., Hager A.T., Sadoff C.J., Cross S.A., McManus A., Farber B.F., Iglewiski J.M.: Production of Exoenzyme S by Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun. 34:147-153. (1981).
- 53.- Sokol A.P., Ohman E.D., Iglewiski H.B.: A More Sensitive Plate Assay for Detection of Protease Production by Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 9: 538-540. (1979).

- 54.- Thomassen M.J., Demko C.A., Bonerbaun B., Stern C.R., Kichenbrod P.: Multiple Isolates of Pseudomonas aeruginosa with differing Antimicrobial Susceptibility Patterns from Patients with Cystic Fibrosis. J. Infect. Dis. 140: 873-880. (1979).
- 55.- Waisbren J.S., Hurley J.D., Waisbren A.B.: Morphological Expressions of Antibiotic Synergism Against Pseudomonas aeruginosa as observed by scanning Electron Microscopy. Antimicrob. Agents Chem. 18: 969-975. (1980).
- 56.- Walker L.H., McLeod Ch.G., Leppla H.S., Mason D.A.: Evaluation of Pseudomonas aeruginosa Toxin A in Experimental Rat Burn Wound Sepsis Infect. Immun. 25: 828-830. (1979).
- 57.- Zierdt C.H., Schmidt P.J.: Dissociation in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 87: 1003-1010. (1964).